



UNIVERSITÀ DI PISA

Corso di Dottorato in Neuroscienze di Base e dello Sviluppo

Presidente: Prof. Giovanni Cioni

**“CONTEXTUAL FEAR CONDITIONING:
ANALISI TRASCRIZIONALE E
TRADUZIONALE NELLE REGIONI
MEDIO-TEMPORALI DEL CERVELLO DI
RATTO”**

Tutor

Dott.ssa Rossana Scuri

Candidato

Dott. Giuseppe Federighi

XXIII CICLO (2008-2010)

SSD BIO/09

ABSTRACT

In contextual fear conditioning (CFC), the response is not conditioned only by the stimulus of fear but also by the environment in which it is presented. The brain regions affected include the middle temporal areas of the brain.

Once subjected to the CFC, the animals show freezing if repositioned in the conditioning apparatus up to 28 days after their training. Electrophysiological recordings performed on hippocampal slices of conditioned rats also showed an increase in excitability in the CA1 area up to 7 days after their training, with a peak at 48 h after conditioning. These prolonged effects over time have suggested the hypothesis that there is a different expression of some genes in the nervous system of conditioned rats than in the unconditioned control (naive) ones, resulting in differential mRNA and protein synthesis.

Using the technique of subtractive and suppressive hybridization, two gene libraries were previously constructed using cDNA obtained from mRNA extracted from mid-temporal regions of the brain of conditioned rats and naive rats sacrificed 48 h after conditioning. The next screening allowed to identify many genes which were candidate to be differentially expressed: 20 of them were confirmed by RT-PCR real time. In the present study, the expression of these 20 genes has been evaluated at different times following conditioning by using cDNA obtained from the total RNA extracted from mid-temporal areas of the brain of both rats subjected to CFC and sacrificed at 72 h, 10 and 20 days after the conditioning and naive rats.

The isolated 20 genes code for proteins involved in synaptic modulation (stathmin I anphiphysin I Profilin 2, ARP3, NAPA and complexin I), in protein turnover (TRIM32 and PMP), in the mitochondrial activity (ATP V6, dynamin 1 and TMM), in apoptosis

(caspase3 and p53) in signal transduction (PEA 15, PKA Ia, 14,3,3 and TIP41) and in various cellular processes (BPGM, RAN and NARD). Each of these genes showed a specific time course of expression after 48 h, when all the genes considered, with the exception of the gene for anphiphysin I, were expressed in significantly higher level than the constitutive ones. Subsequently, Western blot was used to determine whether an increase in gene expression corresponded to an increase in protein synthesis: in particular, the levels of protein synthesis stathmin I anphiphysin I and profilin 2 were assessed. Finally, the use of anti-stathmin I antibodies revealed a marked localization of the protein in the dentate gyrus of the hippocampus of CFC rats sacrificed 48 h after conditioning.

RIASSUNTO

Nel condizionamento contestuale alla paura, o *contextual fear conditioning* (CFC), la risposta è condizionata sia dallo stimolo di paura sia dall'ambiente in cui esso viene presentato. Le regioni cerebrali coinvolte nell'acquisizione e ritenzione di CFC comprendono le aree medio-temporali del cervello.

Studi precedenti hanno mostrato che ratti sottoposti a CFC mostrano la risposta di *freezing* se riposizionati nell'apparato di condizionamento fino a 28 giorni successivi all'addestramento. Registrazioni elettrofisiologiche effettuate su *slices* di ippocampo di ratti condizionati hanno inoltre evidenziato un aumento dell'eccitabilità nello strato CA1 fino a 7 giorni dall'addestramento, con un picco massimo a 48 h dal condizionamento. Questi effetti prolungati nel tempo hanno suggerito l'ipotesi che si avesse una diversa espressione di alcuni geni nel sistema nervoso dei ratti condizionati rispetto a quelli di controllo non condizionati (*naive*), traducibile in una sintesi differenziale di mRNA e proteine.

Mediante la tecnica dell'ibridazione sottrattiva e soppressiva, sono state precedentemente costruite due librerie geniche utilizzando RNA retrotrascritto in cDNA e ottenuto da porzioni medio-temporali di cervelli di ratti condizionati e di ratti *naive* sacrificati a 48 h dal condizionamento. Il successivo *screening* primario ha permesso di isolare molti geni candidati ad essere differenzialmente espressi, di cui 20 sono stati confermati come veri positivi con RT-PCR *real time*.

Nel presente lavoro è stato valutato l'andamento nel tempo dell'espressione di questi 20 geni utilizzando RNA totale retrotrascritto in cDNA ottenuto dall'omogenizzazione di porzioni medio-temporali di cervello di ratti sottoposti a CFC e sacrificati a 72 h, 10 e 20 giorni dal condizionamento e di ratti *naive*.

I 20 geni isolati codificano per proteine coinvolte nella modulazione sinaptica (statmina I, anfifisina I, profilina 2, ARP3, NAPA e complessina I), nel *turn over* proteico (TRIM32 e PMP), nell'attività mitocondriale (ATP V6, proteina simile alla dinamina 1 e TOM20), nei fenomeni apoptotici (caspasi3 e p53), nella trasduzione del segnale (PEA 15, PKA RI α , 14,3,3 ζ e TIP41) e in processi cellulari vari (Bis-fosfoglicerato mutasi, RAN e nardilisina). L'espressione di ciascuno di questi geni ha mostrato uno specifico andamento temporale dopo le 48 h, quando tutti i geni considerati, ad eccezione del gene per anfifisina I, erano espressi in modo significativamente maggiore rispetto ai livelli costitutivi.

Successivamente, mediante Western blot, è stato verificato se alle variazioni di espressione genica corrispondeva una concorde variazione della sintesi proteica: in particolare sono stati saggiati i livelli di sintesi delle proteine statmina I, anfifisina I e profilina 2. Infine, mediante l'uso di anticorpi antistatmina I è stata messa in evidenza una marcata localizzazione della proteina nel giro dentato dell'ippocampo di ratti CFC sacrificati a 48 h dal condizionamento.

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 1
1.1. Apprendimento e memoria	pag. 2
1.2. Il condizionamento Skinneriano	pag. 5
1.3. Il condizionamento Classico	pag. 6
1.4. I fattori che possono influenzare l'apprendimento	pag. 6
1.5. Il paradigma comportamentale del <i>contextual fear conditioning</i> (CFC)	pag. 11
1.6. Classificazione della memoria in funzione del tempo di ritenzione	pag. 18
1.6.1. La memoria a breve termine	pag. 19
1.6.2. La memoria a lungo termine	pag. 26
1.7. Precedenti analisi biologico-molecolari sul CFC	pag. 29
2.SCOPO DELLA TESI	pag. 33
3. MATERIALI E METODI	pag. 34
3.1. Animali	pag. 34
3.2. Procedura di condizionamento	pag. 34
3.3. Isolamento e conservazione dei tessuti	pag. 36
3.4. Analisi trascrizionale	pag. 37
3.4.1 Estrazione RNA	pag. 37
3.4.2. Retrotrascrizione di RNA in cDNA	pag. 39
3.4.3. Analisi di espressione dei geni mediante PCR Real-time	pag. 40

3.5. Western blot	pag. 42
3.6 Immunofluorescenza su <i>slices</i> di ippocampo	pag. 45
3.7. Analisi statistica	pag. 46
4. RISULTATI	pag. 47
4.1. <i>Contextual fear conditioning</i> CFC	pag. 47
4.2. Espressione genica valutata a diversi tempi dal condizionamento nei ratti sottoposti a CFC	pag. 48
4.2.1. Geni coinvolti nella modulazione sinaptica	pag. 48
4.2.2. Geni coinvolti nel <i>turn-over</i> proteico	pag. 53
4.2.3. Geni coinvolti nel processo apoptotico	pag. 55
4.2.4. Geni coinvolti nell'attività mitocondriale	pag. 57
4.2.5. Geni coinvolti nella trasduzione del segnale	pag. 60
4.2.6. Geni coinvolti in funzioni cellulari varie	pag. 63
4.3 Valutazione traduzionale di statmina I, profilina 2 e anifisina I	pag. 65
4.4 Localizzazione mediante immunofluorescenza della proteina statmina I	pag. 67
5. DISCUSSIONE	pag. 69

5.1 Espressione dei geni codificanti per proteine coinvolte nella modulazione sinaptica	pag. 70
5.2 Espressione dei geni codificanti per proteine coinvolte nel <i>turn over</i> proteico	pag. 76
5.3 Espressione dei geni codificanti per proteine coinvolte nei processi apoptotici	pag. 77
5.4 Espressione dei geni codificanti per proteine coinvolte nell'attività mitocondriale	pag. 80
5.5 Espressione dei geni codificanti per proteine coinvolte nella trasduzione del segnale	pag. 82
5.6 Espressione dei geni codificanti per proteine coinvolte in processi cellulari vari	pag. 83
5.7 Modulazione della sintesi proteica indotta da CFC	pag. 84
6. BIBLIOGRAFIA	pag. 86

1. INTRODUZIONE

Per comprendere i meccanismi neurobiologici dell'apprendimento e della memoria l'indagine sperimentale si è orientata verso l'analisi di forme elementari di apprendimento su sistemi neurali nei quali fosse possibile analizzare i cambiamenti plastici alla base dei rapporti stimolo-risposta. Eccellenti risultati sono derivati dalle ricerche condotte sugli Invertebrati e sulle forme di apprendimento non associativo quali l'abitudine (decremento della risposta ad uno stimolo non nocivo presentato ripetutamente ad intervalli costanti) e la sensitizzazione/disabitudine (potenziamento di una risposta ad uno stimolo neutro o di una risposta precedentemente abituata in seguito all'applicazione di uno stimolo nocicettivo). Si ha apprendimento a breve termine (BT) quando dura minuti/ore e a lungo termine (LT) quando dura ore/giorni. L'apprendimento BT può trasformarsi in apprendimento LT. Come ciò avvenga è un importante quesito delle Neuroscienze. I meccanismi cellulari e molecolari alla base dei processi di consolidamento dell'apprendimento hanno cominciato ad essere scoperti a partire dal 1960 quando l'utilizzo di inibitori di mRNA o della sintesi proteica ha consentito di dimostrare, sia nei Vertebrati che negli Invertebrati e in vari tipi di memoria, che negli eventi LT c'è la formazione di nuove proteine per attivazione di meccanismi di trascrizione e trasduzione. I *deficits* di memoria LT venivano osservati se la sintesi di RNA e/o di proteine era inibita in tempi vicini al *training* di apprendimento; aumentando tali tempi, le memorie diventavano progressivamente meno sensibili agli effetti degli inibitori. Ciò ha suggerito che la fase di consolidamento della memoria dipendente dalla sintesi di proteine e/o RNA sia limitata a poche ore dal *training* (Alberini et al., 2006).

Più recentemente, l'uso di differenti modelli animali e di tecniche di biologia molecolare ha consentito di identificare un certo numero di geni che sono regolati dopo l'apprendimento e sono richiesti per la formazione della memoria LT. La maggior parte delle evidenze sperimentali indicano che la via intracellulare del CREB-C/EBP, altamente conservata, gioca un ruolo fondamentale durante la formazione della memoria LT. La natura dei geni bersaglio regolati da CREB e C/EBP rimane però ancora da definire nel dettaglio.

Per quanto riguarda l'apprendimento associativo, particolare attenzione è stata rivolta negli ultimi anni alla metodica del "*fear conditioning*" nel ratto, metodica che permette di seguire distintamente e contemporaneamente l'evoluzione della traccia mnemonica ad uno stimolo condizionato specifico ed al contesto di condizionamento. Con questa metodica è stato descritto il ruolo di varie sedi corticali e sottocorticali nella memorizzazione di queste due distinte tracce, e ciò ha posto le basi per indirizzare più approfondite indagini sui meccanismi cellulari e molecolari della memoria LT.

Il presente lavoro si propone di estendere l'indagine dei meccanismi neurobiologici dell'apprendimento LT utilizzando il modello sperimentale del *contextual fear conditioning* (CFC). L'attenzione è stata focalizzata sull'analisi dei geni coinvolti negli eventi LT a vari tempi dal condizionamento, con un approccio di tipo biologico-molecolare.

1.1 Apprendimento e Memoria

L'apprendimento e la memoria sono i principali fattori che permettono ad un animale di modificare il suo comportamento. L'apprendimento è la capacità di un organismo di trattenere dati e acquisire conoscenze

relative all'ambiente circostante. La memoria consiste invece nel codificare e conservare tali conoscenze.

Sulla base delle modalità di acquisizione e di richiamo dell'informazione, la memoria viene distinta in non-dichiarativa o implicita, detta anche riflessiva, e dichiarativa o esplicita (Fig. 1).

- La memoria non dichiarativa si forma mediante la ripetizione di numerose prove successive e si esprime attraverso il miglioramento di determinate azioni, indipendentemente da processi cognitivi quali consapevolezza e valutazione. Questo tipo di memoria è importante nell'acquisizione di tecniche, procedure particolari, nuovi schemi motori, e nelle risposte emozionali. I circuiti neurali implicati in questo tipo di memoria sono soprattutto quelli corticali e sottocorticali che coinvolgono le strutture della corteccia motoria, dell'ippocampo, del cervelletto, delle vie riflesse e delle zone limbiche, in particolar modo l'amigdala.
- La memoria dichiarativa, al contrario, è controllata direttamente dalla sfera cognitiva sia per l'acquisizione che per il richiamo delle informazioni. Nell'uomo riguarda soprattutto gli eventi biografici dell'individuo nonché le associazioni qualitative e temporali ad essi correlate (memoria semantica). Per queste sue caratteristiche può venire espressa tramite affermazioni verbali di tipo dichiarativo, mentre le informazioni relative alla memoria implicita si prestano con difficoltà ad essere comunicate verbalmente dal soggetto. I centri nervosi principalmente coinvolti nella memoria dichiarativa sono le cortecce associative polimodali (corteccia prefrontale, limbica e parieto-temporo-occipitale), le cortecce paraippocampale, peririnale, entorinale, e l'ippocampo. In certi casi comunque la memoria dichiarativa può essere trasformata

in memoria non dichiarativa tramite numerose ripetizioni successive; l'apprendimento di una procedura, per esempio, può richiedere inizialmente l'uso di processi cognitivi ma, in seguito a un certo numero di ripetizioni, l'esecuzione può divenire automatica.

Una valutazione sperimentale della memoria implicita si realizza applicando con certe modalità degli stimoli, che rappresentano le informazioni relative all'ambiente esterno, osservando e valutando poi le progressive modificazioni comportamentali. Questo tipo di approccio sperimentale ha permesso di studiare l'apprendimento e di classificarlo in non associativo e associativo. Nell'apprendimento non associativo l'organismo viene sottoposto a un solo tipo di stimolo. Esempi di apprendimento non associativo sono l'abitudine e la sensitizzazione. Per abitudine si intende una diminuzione della risposta comportamentale riflessa di un organismo in seguito alla ripetuta presentazione di uno stimolo non nocivo. Con il termine sensitizzazione, invece, si indica un aumento della risposta a una serie di stimoli non nocivi in seguito a una stimolazione intensa o dolorosa. L'apprendimento associativo prevede l'associazione tra uno stimolo e la risposta del soggetto o tra due tipi di stimoli. In base alle metodologie sperimentali utilizzate esso viene classificato come condizionamento operante (o skinneriano) e condizionamento classico (o pavloviano).

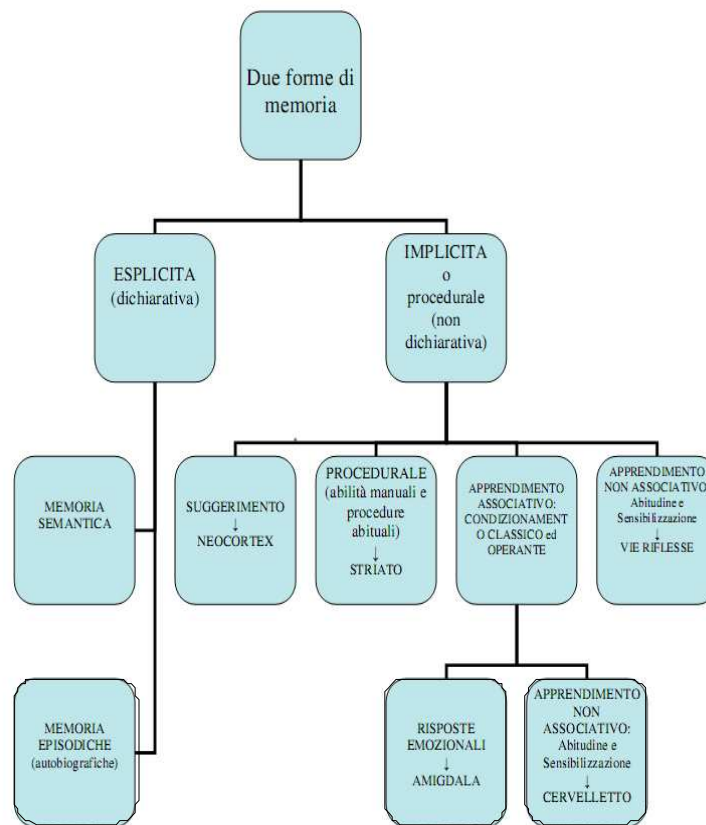


Fig. 1: Schema riassuntivo dei vari tipi di memoria.

1.2 Il condizionamento skinneriano

Una forma di apprendimento associativo è il condizionamento operante, scoperto da Edward Thorndike e studiato da B.F. Skinner e collaboratori. Definito anche condizionamento strumentale o apprendimento per prova-errore, il condizionamento operante consiste nell'associazione da parte del soggetto di un comportamento, definito operante, con un certo tipo di risposta. Quando un comportamento da parte del soggetto determina una risposta ambientale positiva, detta di rinforzo, l'azione viene ripetuta con una frequenza sempre maggiore. Se invece la risposta ambientale è negativa (punizione) o neutra, il soggetto tende a non ripetere l'azione. Affinché avvenga una corretta associazione da parte del soggetto tra il comportamento operante e il

rinforzo (o la punizione) è fondamentale che l'intervallo temporale tra i due eventi sia regolare e sufficientemente breve

1.3 Il condizionamento Classico

Il condizionamento classico fu introdotto dal fisiologo ed etologo Ivan Pavlov: si basa sull'apprendimento da parte degli animali condizionati delle relazioni che intercorrono tra due stimoli distinti e nella conseguente acquisizione della capacità di rispondere a stimoli inizialmente neutri (Pavlov, 1927). Nel paradigma di condizionamento classico, uno stimolo incondizionato (US, *Unconditioned Stimulus*), ad esempio la vista del cibo o una scossa elettrica applicata agli arti posteriori, la cui applicazione produce sempre una risposta incondizionata innata (come un aumento della salivazione alla vista del cibo) viene applicato con una latenza costante insieme a uno stimolo condizionato (CS, *Conditioned Stimulus*) sonoro o visivo, che invece non è in grado da solo di produrre una risposta apprezzabile. Durante la fase di condizionamento i due stimoli vengono ripetutamente associati: ad ogni applicazione di CS segue una corrispondente applicazione di US ad un intervallo di tempo fisso. In seguito a un certo numero di prove, l'applicazione del solo CS sarà in grado di produrre una risposta condizionata (RC) del tutto simile alla risposta incondizionata scatenata da US.

1.4 Fattori che possono influenzare l'apprendimento

L'apprendimento può essere modulato da vari fattori e condizioni. Da molti anni sono noti gli effetti di un ambiente ricco di stimolazioni (ambiente arricchito, AA) sulle capacità di apprendimento e memoria (Fig 2). L'arricchimento ambientale è stato a lungo sfruttato per

studiare l'influenza dell'ambiente sulla struttura e funzione del cervello. Indagini morfologiche e funzionali, a livello neuronale, hanno evidenziato gli effetti stimolanti indotti da AA nel migliorare le performance cognitive in numerosi test di apprendimento, da quelli di apprendimento spaziale e di tipo *problem solving* fino a quelli di ritenzione a lungo termine (Kempermann et al., 1997). In particolare, nei test di apprendimento spaziale valutato utilizzando il labirinto di Morris, i topi allevati in ambiente arricchito ottengono risultati migliori rispetto agli animali allevati in condizioni standard (Nilson et al., 1999). Inoltre si è osservato un incremento dell'attività esplorativa da parte degli animali sottoposti al test dell'*open field* (Larsson et al., 2002).

AA agisce anche sulla modulazione dell'espressione di un elevato numero di geni, molti dei quali legati ai fenomeni di plasticità del sistema nervoso. Rampon e collaboratori (2000) hanno analizzato gli effetti di AA sull'espressione di un elevato numero di geni nel topo. Sia a breve termine (3-6 h) che a lungo termine (2-14 g) i topi mantenuti in AA mostrano un aumento di circa un centinaio di trascritti genici superiore al 50% rispetto ai topi allevati in ambiente standard. Un esempio è dato dal gene della proteina PSD-95 che varia da 700%, dopo due giorni, al 230%, dopo quattordici giorni; addirittura il gene della DNA metiltrasferasi (coinvolta nella corretta metilazione del DNA durante la replicazione e la riparazione) raggiunge livelli del 1000%.

A**B**

Fig. 2 : Ambienti in cui possono essere allevati i topi. (A): ambiente standard in cui gli animali vivono in piccoli gruppi; (B) ambiente arricchito per stimolare il movimento e la percezione visiva.

Come accennato precedentemente, l'ippocampo è coinvolto nella formazione di alcuni tipi di memoria, e si assume generalmente che i fenomeni di plasticità sinaptica che avvengono in questa struttura anatomica contribuiscano all'acquisizione e al consolidamento delle memorie. In molte specie di mammifero, incluso l'uomo, il giro dentato dell'ippocampo genera nuovi neuroni (neurogenesi), principalmente dei granuli, per tutta la vita adulta (Eriksson et al., 1998). Questi nuovi neuroni si integrano in circuiti funzionali. La coincidenza di questi eventi - neurogenesi e apprendimento - nella stessa regione del cervello suggerisce che esista un legame fra neurogenesi ippocampale adulta e funzione ippocampale. La neurogenesi (proliferazione di precursori neurali, sopravvivenza, migrazione e differenziamento in senso morfologico, biochimico e funzionale delle cellule neonate) e

l'apprendimento ippocampo-dipendente sono modulati dagli stessi fattori (per una review vedi Kempermann, 2006). Indicazioni che i nuovi neuroni siano necessari nella funzione ippocampale sono state ottenute dimostrando un deficit in alcuni tipi di apprendimento ippocampo-dipendente (*trace conditioning*) in seguito a una riduzione sostanziale nel numero di nuove cellule nel giro dentato (Shors et al., 2001, 2002) correlata all'apprendimento. Inoltre, recenti studi dimostrano che sia AA che l'aumentato esercizio fisico inducono un aumento del numero di neuroni neogenerati nel giro dentato dei roditori adulti (Kempermann et al., 2003). Durante l'apprendimento, i livelli di neurotrofine, in particolare di BDNF, una molecola che regola la sopravvivenza e il differenziamento neuronale, nota per svolgere anche un ruolo cruciale nella plasticità sinaptica, nella *long term potentiation* (Huang and Reichardt, 2001; Chao, 2003), aumentano nel cervello (Gomez-Pinilla et al., 2001) e questi fattori, che agiscono attraverso i recettori Trk e p75NTR possono promuovere la sopravvivenza o la morte dei neuroni (Majdan, Miller, 1999; Yoon, 1998, Kalb, 2005). Anche AA induce cambiamenti sui livelli di sintesi delle neurotrofine, quali BDNF e NGF nei topi (Angelucci et al, 2007; Berardi et al, 2007; Sale et al, 2004, 2009). L'importanza del BDNF e della regolazione della sua sintesi nei fenomeni di apprendimento è dimostrata da un crescente numero di evidenze sperimentali che indicano come, ad esempio, l'inibizione della via di segnale di BDNF mediata da TrkB nell'ippocampo o nell'amigdala porti ad un peggioramento nell'acquisizione, nella ritenzione e nel *recall* della memoria in test quali il *water maze*, e *passive avoidance* (Linnarsson et al., 1997; Minichiello et al., 1999; Mu et al., 1999; Alonso et al., 2002; Rattiner et al., 2004). Altri studi evidenziano che il blocco della funzione di BDNF con oligonucleotidi antisenso nell'ippocampo può peggiorare la memoria LT nel *contextual fear conditioning* (CFC) (Lee et al., 2004).

Ci sono invece dati contrastanti sul ruolo di BDNF nella formazione della memoria BT (Alonso et al., 2002; Lee et al., 2004). Recentemente il polimorfismo umano in BDNF, Val66Met, che porta ad una riduzione della secrezione di BDNF attività-dipendente, è stato associato a deficit di memoria BT ippocampo-dipendente (Chen et al., 2004, 2006).

Nel corso degli ultimi 20 anni è diventato sempre più evidente che il sistema immunitario giochi un ruolo importante nel modulare l'apprendimento, la memoria e più in generale la plasticità neuronale. In condizioni di normale attività non stimolata, i meccanismi immunitari possono essere attivati da stimoli ambientali/psicologici e regolare positivamente il rimodellamento dei circuiti neurali promuovendo il consolidamento della memoria, la LTP ippocampale e la neurogenesi.

Questi effetti benefici del sistema immunitario sono mediati da complesse interazioni tra le cellule del sistema nervoso con funzioni immunitarie (astrociti e microglia), le cellule immunitarie periferiche (cellule T e macrofagi), neuroni e precursori delle cellule nervose. Tali interazioni prevedono che cellule non nervose rispondano ai neurotrasmettitori (es. glutammato e monoammine) o a ormoni (es. glucocorticoidi) e che i neuroni e le cellule gliali producano e rispondano a bassi livelli di citochine infiammatorie quali IL-1, IL-6, TNFa e altri mediatori quali le prostaglandine e le neurotrofine.

Recenti studi hanno ipotizzato che l'efficienza del sistema immunitario possa migliorare le prestazioni di apprendimento e memoria Yirmiya & Goshen (2011). Schwartz e collaboratori (2010) hanno condotto studi sul possibile ruolo delle cellule T, a livello del sistema nervoso, in particolar modo nel meccanismo della neurogenesi e a livello cognitivo. Evidenze sperimentali, a tale proposito, sono state ottenute nei topi immunodeficienti SCID (*severe combined immune deficiency*)

i quali mostrano deficit di apprendimento spaziale valutato con il metodo del *Morris water-maze* (Kipnis et al., 2004; Ron-Harel et al., 2008) e un indebolimento delle prestazioni nei test di valutazione, *Barnes water free-maze*, *Radial arm water-maze*, *Recognition of novel spatial arrangement of familiar objects*; (Ron-Harel et al., 2008). Se topi adulti SCID ricevono midollo osseo da topi *wild type*, i primi mostrano una corretta esecuzione della prova nel *Morris water-maze*, mentre, viceversa, se topi *wild type* ricevono midollo da topi SCID i primi esibiscono marcati deficit mnemonici (Brynskish et al., 2008).

Gli spazi inter-meningei costituiscono un'importante riserva di cellule T (Schwartz & Shechter, 2010). Derecki e collaboratori (2010) hanno osservato che durante prestazioni cognitive si ha un aumento del numero delle cellule T nelle meningi; mentre una loro diminuzione comporta deficit mnemonici. Ad esempio, durante il paradigma del *Morris water-maze* le cellule T esprimono elevati livelli di IL-4 che sembrano avere un ruolo importante nel consentire le prestazioni cognitive. Infatti topi deficitari di IL-4 imparano con maggiori difficoltà (Derecki et al., 2010).

1.5 Il paradigma comportamentale del contextual fear conditioning (CFC)

Per studiare più selettivamente l'influenza dell'ambiente sull'apprendimento e sulla plasticità neuronale e poter analizzare le modificazioni geniche che sembrano essere alla base degli eventi di memoria LT, la nostra ricerca si è concentrata su un semplice modello di arricchimento che è il *contextual fear conditioning* (CFC), o condizionamento contestuale alla paura che è stato studiato nel topo e nel ratto.

Durante questa procedura gli animali vengono inseriti in un apparato di condizionamento e vengono lasciati liberi di esplorare la camera per alcuni minuti in modo da poter acquisire informazioni generali sull'ambiente circostante. In seguito viene applicato agli animali un pattern di scariche elettriche che rappresentano l'US, lo stimolo nocivo. Quando l'animale condizionato viene reinserito nell'apparato di condizionamento senza l'applicazione di stimoli nocivi (*retrieval test*) mostra una risposta di *freezing* (totale assenza di movimento fatta eccezione per i movimenti oculari e respiratori). In CFC è l'ambiente o contesto, inteso come l'insieme di tutte le informazioni sensoriali recepibili durante l'addestramento, a rappresentare il CS e a scatenare la risposta condizionata. Infatti il *freezing* non viene rilevato nel caso in cui l'animale condizionato venga immesso in un ambiente diverso da quello di condizionamento.

Recenti studi hanno mostrato che nel topo l'integrità della via che porta alla sintesi di NO è fondamentale per l'instaurarsi e il mantenimento di CFC (Kelley et al., 2010, 2011).

In uno studio condotto da Sacchetti et al. (2001) sono stati presi in considerazione quattro gruppi di ratti: ratti condizionati (animali soggetti a CFC), *exploration* (animali che avevano esplorato liberamente l'apparato), *naïve* (animali che non erano entrati mai nell'apparato di condizionamento) o *shock-only* (animali che avevano ricevuto lo stesso numero di scosse di intensità pari a quella dei condizionati, ma a intervalli minori così da non poter associare US al contesto). I ratti condizionati esibivano *freezing* duraturo quando sottoposti a *retrieval test* 10 minuti, 1 giorno, 7 giorni e 28 giorni dopo il condizionamento, mentre, agli stessi intervalli di tempo, la risposta condizionata di paura non era osservabile negli animali *exploration*, *shock-only* e naturalmente negli animali *naïve* in accordo con quanto

precedentemente osservato da Fanselow (1990) e Milanovich et al. (1998) (Fig. 3).

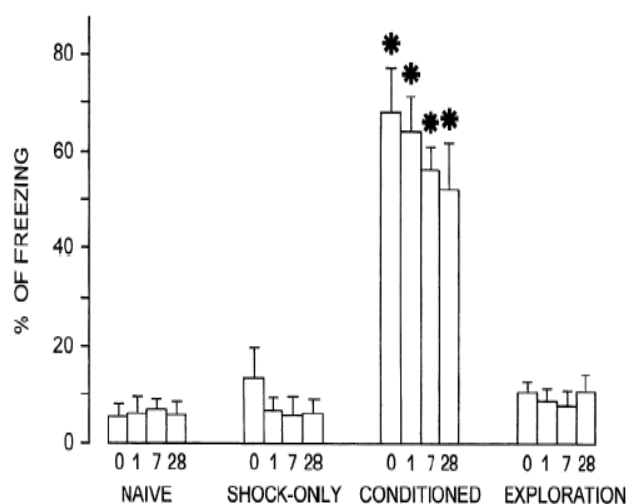


Fig. 3: Durata della risposta di *freezing* nei 4 gruppi sperimentali considerati subito dopo il CFC (0), 1, 7 e 28 giorni dopo il condizionamento (tratto da “Sacchetti et al., 2001).

CFC è legato all’attivazione sia dell’amigdala che dell’ippocampo (Phillips & LeDoux, 1992; Rodrigues et al., 2001). L’ippocampo ha un’importanza fondamentale nella formazione e nel consolidamento delle relazioni tra situazioni o stimoli diversi (Rudy et al., 2004; Anagnostaras et al., 2001). In particolare l’ippocampo sarebbe importante nell’associazione di più stimoli durante il condizionamento. In seguito alla costruzione di un quadro unificato del contesto, l’ippocampo si attiverebbe solo per richiamare le associazioni formate precedentemente. Infatti, se l’ippocampo viene danneggiato prima o subito dopo il condizionamento si ha perdita delle risposte di paura, mentre le lesioni effettuate diversi giorni dopo l’addestramento non impediscono l’acquisizione delle risposte condizionate (O’Keefe & Nadel, 1978; Morris et al., 1986; Squire, 1992; Young et al., 1994; McNisch et al., 1997; Burgess et al., 1999). È interessante notare che l’inibizione sperimentale della funzionalità dell’ippocampo induce

amnesia solo nel caso della ritenzione della memoria della paura contestuale (Phillips & LeDoux, 1992). Queste evidenze indicano nell'ippocampo il centro dell'acquisizione e del mantenimento temporaneo di CS, ossia del contesto.

Uno studio elettrofisiologico, condotto su *slices* di ippocampo ottenute da cervelli di ratti *exploration*, *shock-only*, *naive* e sottoposti a CFC e sacrificati a diversi intervalli di tempo dal condizionamento, ha evidenziato che a livello delle sinapsi tra gli assoni dei neuroni dello strato CA3 e i dendriti dei neuroni del campo CA1 si ha un aumento dell'eccitabilità in rapporto diretto con il consolidamento della risposta di *freezing* (Sacchetti et al., 2001) nei ratti CFC. (Fig. 4).

In questo studio sono state misurate le modificazioni dell'eccitabilità ippocampale calcolando le curve di input/output (IOC), tramite l'applicazione di un singolo stimolo di bassa intensità.

Dalle registrazioni è emerso che a 28 giorni dal condizionamento tutti e 4 i gruppi di animali analizzati mostrano un andamento delle curve del tutto paragonabile, mentre gli animali CFC mostrano un aumento dell'eccitabilità sinaptica a 1 e a 7 giorni dopo il condizionamento, mentre nel gruppo degli *exploration* è stato osservato un aumento dell'eccitabilità solo a breve distanza di tempo dall'esplorazione. Ciò indica che gli stimoli contestuali da soli sono in grado di attivare i meccanismi che generano eccitabilità sinaptica, ma questi meccanismi si disattivano se gli stimoli contestuali non vengono associati a stimoli nocivi.

Il fatto che l'aumento dell'eccitabilità sinaptica sia registrabile solo fino a sette giorni dopo il CFC mentre la risposta di *freezing* permanga fino a 28 giorni dal condizionamento (Fig. 3 e Fig. 4) indica che

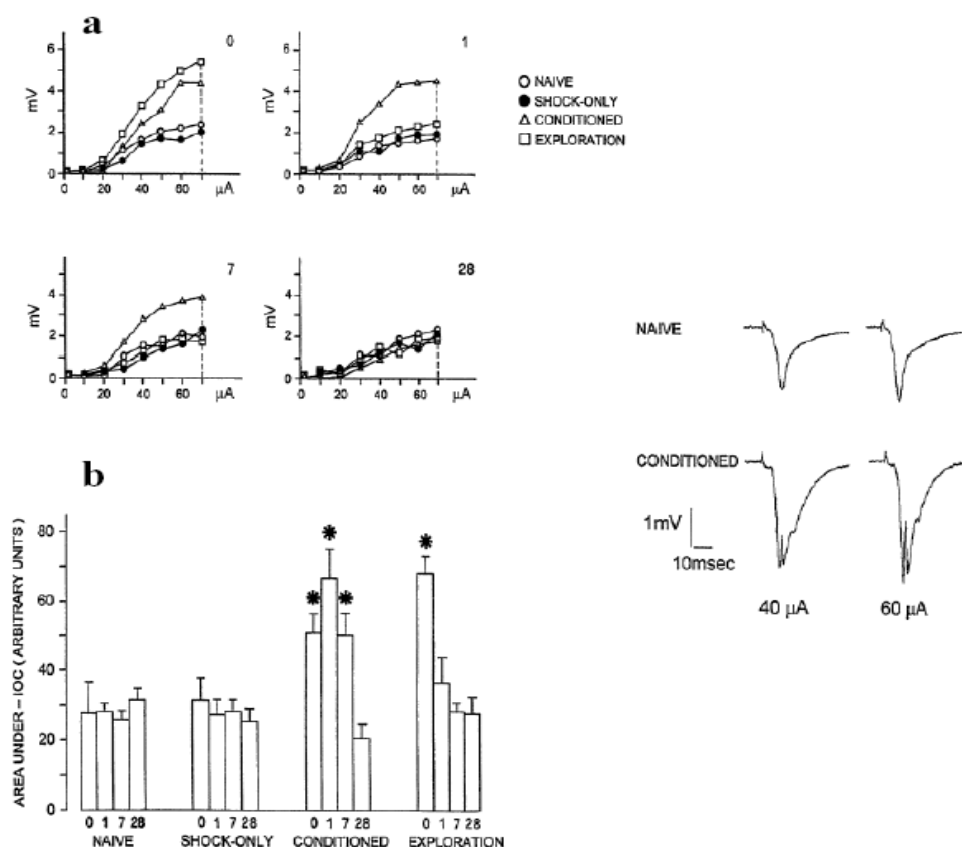


Fig. 4: Paradigmi comportamentali e curve di input-output (IOC).

(a) Le curve mostrano i valori medi in mV di ciascun gruppo ad intensità di stimolazione crescenti (0 - 70 μ A). Le registrazioni sono state ottenute in *slices* di ippocampo preparate immediatamente dopo (0), 1, 7 e 28 giorni dopo il condizionamento per tutti i paradigmi: *conditioned*, *exploration*, *shock-only*. (b) Gli istogrammi mostrano le aree sotto IOC, ovvero la somma delle medie delle ampiezze dei fEPSPs ottenute per le otto intensità di stimolazione utilizzate. * indica $P < 0.01$ vs. i rispettivi gruppi di controllo (Sacchetti et al., 2001).

l'ippocampo non è direttamente coinvolto nella conservazione a lungo termine della risposta contestuale alla paura. La riduzione dell'incremento dell'attività sinaptica che si ha dopo sette giorni dall'addestramento può essere dovuta alla trasformazione delle tracce mnemoniche appena consolidate in altre forme di memoria immagazzinate in altre strutture cerebrali.

Gli effetti di CFC sull'eccitabilità sinaptica sono stati studiati anche analizzando le risposte sinaptiche nella regione CA1 dell'ippocampo in seguito a stimolazioni tetaniche ad alta frequenza

(HFS), in *slices* ottenute da cervelli di ratti sacrificati subito dopo il condizionamento, dopo 1 e 7 giorni (Sacchetti, et al., 2002) (Fig. 5).

Normalmente in seguito a stimolazione HFS si osserva un precoce e transiente potenziamento dell'attività sinaptica conosciuto come *short-term potentiation* (STP) (Malenka, 1991; Bliss & Collingridge, 1993;

Schulz et al., 1994), seguito da un potenziamento più duraturo detto *long-term potentiation* (LTP). Nel caso dei ratti sottoposti a CFC, invece, si nota una diminuzione di STP che inizia subito dopo il condizionamento e permane per alcune ore e una diminuzione di LTP, ancora presente a 24 ore dal condizionamento, ma non dopo sette giorni. Queste modificazioni non sono osservabili nei ratti *naïve* né

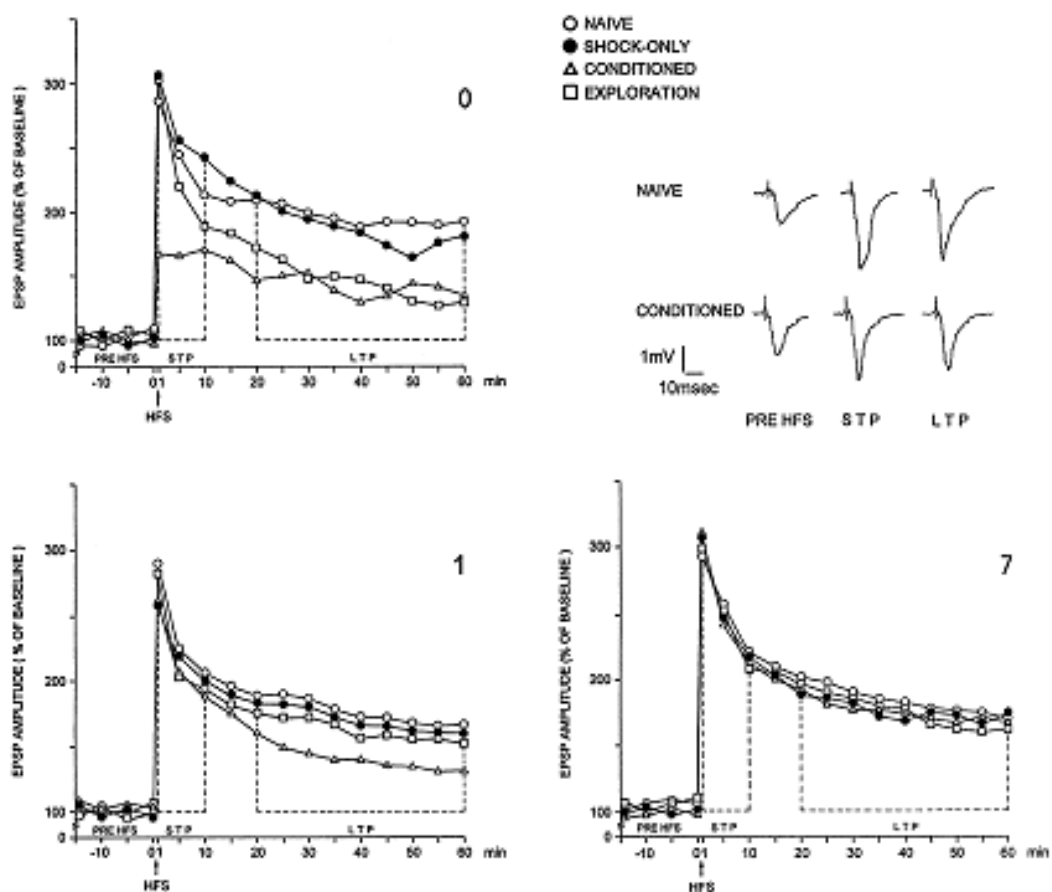


Fig. 5: STP e LTP osservate nella regione CA1 di ippocampo di ratti sottoposti alle 4 diverse condizioni e sacrificati a vari tempi: immediatamente dopo il condizionamento (0), dopo 1 giorno (1) e dopo 7 giorni (7).

Le curve mostrano i valori percentuali rispetto alla *baseline* pre-HFS di ciascun gruppo di animali considerati ai diversi tempi presi in esame. (modificata da: Sacchetti et al., 2002).

negli *shock-only*, dunque appaiono direttamente correlate a CFC. Nei ratti *exploration* sono presenti diminuzioni di LTP ma solo immediatamente dopo il condizionamento; STP invece non risulta mai modificato (Sacchetti, et al., 2002; Waters et al., 1997).

Il fatto che la diminuzione di STP sia misurabile solo subito dopo il condizionamento suggerisce che questa modificazione sia correlata alla fase di associazione CS-US, che si verifica immediatamente al termine del condizionamento, e non al consolidamento dell'associazione stessa, che avviene invece successivamente. Altri studi hanno evidenziato una riduzione di LTP prima e dopo un aumento dell'attività sinaptica (Huang et al., 1992) e un incremento dell'eccitabilità sinaptica associato a un calo dell'induzione di LTP nella corteccia motrice di ratti in seguito ad apprendimento di compiti motori (Rioult-Pedotti et al., 2000). Sembra quindi che il rafforzamento dell'attività sinaptica, durante i processi di consolidamento della memoria, coinvolga un meccanismo LTP-simile (Martin & Shapiro, 2000).

L'amigdala sembra coinvolta nell'associazione fra US e CS, nell'elaborazione delle singole entrate sensoriali, nell'attribuzione ad esse di un significato emotivo e nella produzione delle risposte di paura (Maren & Fanselow, 1996; Lee et al., 1996). L'inattivazione dell'amigdala durante la fase di acquisizione determina amnesia sia durante il paradigma di condizionamento alla paura acustico che contestuale (Phillips & LeDoux, 1992; Rosen et al., 1992; Maren et al., 1996).

Diverse altre aree corticali sembrano essere implicate nell'apprendimento in seguito a CFC. In particolare, la corteccia prefrontale sembra svolgere un ruolo importante nel modulare le risposte agli stimoli nocivi utilizzati per indurre il condizionamento, mentre la corteccia frontale e quella parietale sembrano fondamentali per la risposta di *freezing* (indotto sia dal condizionamento alla paura acustico

che contestuale), mentre la corteccia peririnale sembra essere necessaria sia per la fase di acquisizione che per la fase di consolidamento della traccia mnemonica in seguito a condizionamento alla paura (Sacchetti et al., 1999b). E' stato suggerito che durante la fase di acquisizione l'informazione acustica giunga all'amigdala tramite la corteccia frontale e parietale (Le Doux, 2000). In condizioni normali la corteccia prefrontale, tramite le sue connessioni con l'amigdala, inibisce lo stato di paura (Morgan & Le Doux, 1995). Poco è ancora noto circa le vie che trasferiscono le informazioni riguardanti il contesto all'ippocampo; i risultati ottenuti in seguito ad inattivazione di quest'area tramite somministrazione di lidocaina (LIDO) nel ratto e nei primati (Morgan & Le Doux, 1995; Le Doux, 2000) consentono di ipotizzare che le informazioni contestuali possano raggiungere l'ippocampo tramite questa area corticale. Ciò sottolinea da una parte l'importanza delle strutture nervose dell'amigdala, dell'ippocampo e di alcune aree corticali a loro adiacenti nei processi di apprendimento e memoria legati al condizionamento alla paura, dall'altra come l'apprendimento relativo agli stimoli nocivi sia un modello diffuso nel mondo animale che coinvolge circuiti neurali simili nelle diverse specie di vertebrati.

1.6 Classificazione della memoria in funzione del tempo di ritenzione

Sulla base delle modalità di acquisizione e perdita della memoria è possibile parlare di memoria a breve termine (BT) e di memoria a lungo termine (LT). Inizialmente le informazioni vengono acquisite dal soggetto sottoforma di tracce mnemoniche che vengono conservate nel magazzino della memoria BT che si attiva quindi solo durante la prima fase di acquisizione delle informazioni. Le tracce presenti nel

magazzino BT vengono dimenticate velocemente, nel giro di pochi minuti, a meno che non vengano processate e trasformate in tracce mnemoniche più persistenti. In questo caso vengono trasferite nel serbatoio della memoria a lungo termine, dove permangono a lungo. Per completare il modello è stata proposta l'esistenza di un sistema per la ricerca e l'espressione delle tracce mnemoniche necessarie per lo svolgimento di compiti specifici. L'alterazione di questo (e solo di questo) sistema spiegherebbe la momentanea amnesia di origine traumatica.

1.6.1 La memoria a breve termine (BT)

Nella memoria BT le informazioni vengono conservate solitamente per pochi minuti, anche se in alcuni casi vengono mantenute per un periodo di tempo più lungo, fino a un massimo di 24 ore. Nella memoria LT invece le informazioni vengono conservate per giorni, mesi, anni e, in certi casi, per tutta la vita di un individuo. A lungo si è discusso se la diversa durata delle memorie BT e LT potesse avere alla base un diverso meccanismo. Per arrivare ad una precisa comprensione dei vari processi mnemonici sono state applicate varie tecniche di analisi sperimentale.

La memoria BT è stata studiata principalmente tramite tecniche elettrofisiologiche misurando l'attività elettrica dei neuroni coinvolti in questi processi mnemonici, in modelli elementari soprattutto di Invertebrati, quali *Aplysia californica*, *Hirudo medicinalis*, *Caenorabditis elegans*, *Hermisenda* (Blackwell, 2006, Hudo et al., 2005, Rose & Rankin, 2001; Scuri et al., 2007).

Data la relativa semplicità del sistema nervoso di questi animali rispetto a quello dei vertebrati è stato possibile analizzare in dettaglio le forme dell'apprendimento non associativo quali l'abitudine e la

sensitizzazione. Gli studi condotti dalla scuola di Eric Kandel su *Aplysia californica* hanno portato alla comprensione dei meccanismi alla base dell'apprendimento non associativo. Particolarmente studiato in *A. californica* è stato il riflesso con funzione difensiva della retrazione delle branchie e del sifone in seguito a stimoli tattili applicati alla testa dell'animale. La ripetuta presentazione di stimoli non nocivi provoca nell'animale una diminuzione della risposta riflessa, nota come abitudine. Registrazioni elettrofisiologiche effettuate sugli interneuroni e sui motoneuroni responsabili della retrazione del sifone evidenziano una riduzione dell'ampiezza dei potenziali postsinaptici eccitatori indotti dalle cellule sensoriali. Questa diminuzione, dipende a sua volta da un minore rilascio di neurotrasmettitore a livello delle terminazioni presinaptiche dei neuroni sensoriali e degli interneuroni. Una sola seduta produce un'abitudine della durata di alcuni minuti. Se le sedute si ripetono quotidianamente a intervalli regolari l'abitudine diventa a lungo termine e permane fino a tre settimane. Sempre in *Aplysia* è stato studiato anche il meccanismo della sensitizzazione. In questo caso l'applicazione di uno stimolo tattile nocivo provoca un aumento della risposta riflessa di retrazione. L'analisi molecolare ha evidenziato un aumento dei livelli di serotonina (5-HT) che, attraverso la formazione di secondi messaggeri quali il cAMP (Brunelli et al., 1976), modula la permeabilità agli ioni K^+ attraverso la regolazione di uno specifico canale, il canale K_s che è aperto in condizioni di riposo e si chiude su azione del cAMP (Klein et al., 1982; Dale et al., 1988). Ciò comporta un allungamento della durata del potenziale d'azione e un conseguente maggiore rilascio di neurotrasmettitore (Brunelli et al., 1976).

Analisi elettrofisiologiche condotte sui neuroni sensoriali tattili di "*Hirudo medicinalis*" hanno mostrato la possibilità di indurre modificazioni dell'efficacia sinaptica in seguito a stimolazioni ripetute, suggerendo che anche in questo modello alla base di forme di

apprendimento non associativo vi sia una modulazione sinaptica a carico delle cellule sensoriali (Scuri et al., 2002; 2007).

Nei vertebrati, l'indagine sui meccanismi dell'apprendimento BT si è focalizzata su strutture delle regioni medio temporali del cervello e in particolare sull'ippocampo. modificazioni dell'efficacia sinaptica in seguito a stimolazioni ripetute, suggerendo che anche in questo modello alla base di forme di apprendimento non associativo vi sia una modulazione sinaptica a carico delle cellule sensoriali (Scuri et al., 2002; 2007).

Nei vertebrati, l'indagine sui meccanismi dell'apprendimento BT si è focalizzata su strutture delle regioni medio temporali del cervello e in particolare sull'ippocampo. Stimolazioni elettriche che attivino i circuiti della formazione ippocampale sono in grado di indurre cambiamenti a lungo termine, probabilmente, responsabili dell'apprendimento. Bliss e Lømo (1973) nel coniglio hanno trovato che alcune sinapsi dell'ippocampo manifestano cospicue alterazioni funzionali se usate ripetutamente. Se in una delle vie nervose dell'ippocampo vengono somministrati occasionali ed isolati potenziali d'azione, di quest'ultimi non rimane una durevole traccia nel neurone presinaptico. Diversamente, reiterate brevi scariche elettriche, ad alta frequenza (Kalil 1990) causano un potenziamento a lungo termine (LTP) nel neurone postsinaptico, tale che successivi isolati potenziali d'azione generano nel neurone postsinaptico una risposta fortemente amplificata. L'effetto dura per parecchie ore in un animale anestetizzato e per giorni o settimane in un animale vigile, in rapporto al numero e all'intensità della raffica di reiterate scariche ricevute. Premesso che ogni neurone postsinaptico del cervello forma numerosissime sinapsi con altri neuroni presinaptici, è stato osservato che il potenziamento a lungo termine si verifica solo a carico delle sinapsi attivate da reiterate scariche di potenziali d'azione. Al contrario, nella stessa cellula

postsinaptica le sinapsi non attivate risultano estranee al potenziamento a lungo termine. Tuttavia se una di quest'ultime capta un potenziale d'azione isolato mentre il neurone postsinaptico sta ricevendo una raffica di scariche di potenziali d'azione, anche questa sinapsi subisce il potenziamento a lungo termine (in un altro momento lo stesso potenziale d'azione isolato inviato a questa sinapsi, non avrebbe lasciato tracce durevoli).

Le vie eccitatorie ippocampali principali sono 3: la via perforante, che va dal *subiculum* alle cellule granulari dell'ilo del giro dentato; la via delle fibre muscoidi, rappresentata dai prolungamenti assonali delle cellule dei granuli che innervano i neuroni piramidali dello strato CA3; la via delle collaterali di Schaeffer, dai neuroni dello strato CA3 a quelli dello strato CA1. L'applicazione di una breve scarica di stimoli ad alta frequenza in una qualunque delle tre vie eccitatorie ippocampali determina un aumento dell'ampiezza dei potenziali eccitatori nei neuroni postsinaptici (LTP) (Fig. 6).

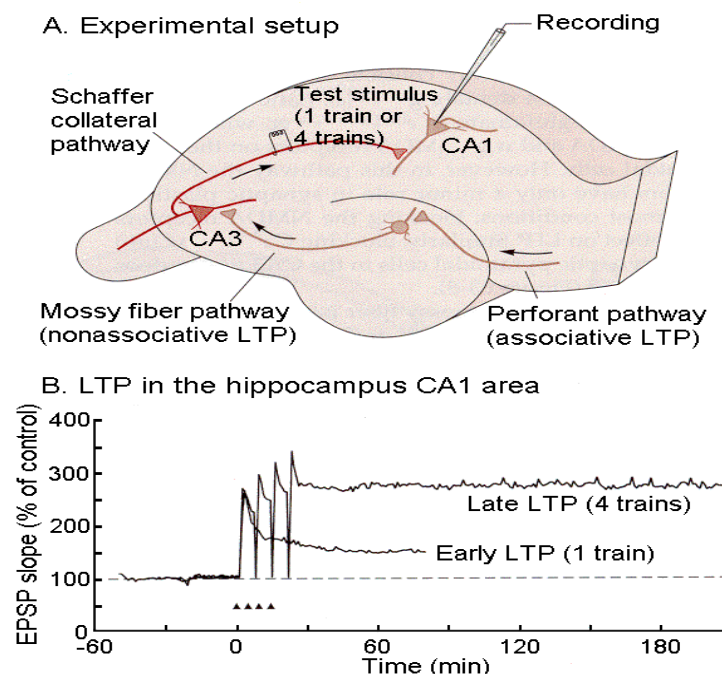


Fig. 6: Induzione di LTP in seguito a stimolazione ad alta frequenza delle vie eccitatorie ippocampali (tratto da: Bliss et Lømo, 1973).

Il recettore NMDA del glutammato è il recettore coinvolto in LTP.

Infatti, quando viene selettivamente bloccato da un inibitore specifico,

l'acido amminofosfovalerico o AP5 (Morris et al. 1986), il potenziamento non si verifica, anche se continua la normale trasmissione sinaptica.

Il potenziamento a lungo termine, ha inizio quando il neurotrasmettitore glutammato, si lega ai recettori AMPA e promuove la depolarizzazione della membrana postsinaptica. La depolarizzazione della membrana postsinaptica annulla il blocco esercitato dallo ione Mg^{2+} sul canale associato al recettore NMDA e consente l'ingresso degli ioni calcio nel neuroplasma postsinaptico. Quest'ultimi possono attivare differenti proteinchinasi (CaMK, PKC, PKA e TRK) che portano all'induzione del potenziamento a lungo termine. Quest'ultimo viene impedito se i livelli di Ca^{2+} intracellulari vengono artificialmente mantenuti bassi nel neurone postsinaptico. I dati più recenti indicano che LTP ippocampale è sostenuto da cambiamenti morfologici a carico del citoscheletro del neurone quali la formazione di nuove spine dendritiche o l'allargamento di spine preesistenti (Fig. 7). Esperimenti condotti su cellule ippocampali di ratto in coltura hanno mostrato che la formazione di nuove spine potrebbe derivare dall'inserzione di endosomi riciclati i quali contengono recettori AMPA che in poco tempo vengono inseriti nelle membrane delle nuove spine (Park et al., 2006). Una volta inseriti, i recettori AMPA stabilizzano la forma delle nuove spine che stabiliscono un contatto fisico con bottoni presinaptici esistenti e in breve tempo formano sinapsi funzionali (Nagerl et al., 2007). Le vie molecolari che sostengono l'induzione e l'espressione di nuove spine dendritiche sono complesse. Uno schema riassuntivo è presentato in figura 8, dove accanto alle vie intracellulari che vedono il coinvolgimento di CamKs e fattori di modulazione dell'actina è proposto anche il coinvolgimento di fattori di trascrizione quali il CREB che promuove la sintesi di nuove proteine.

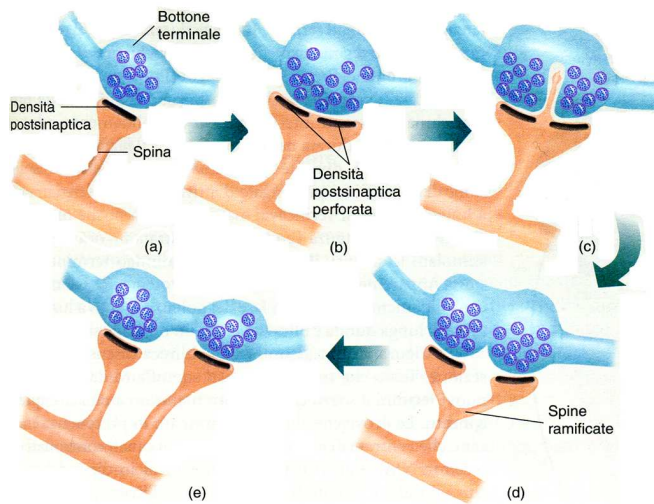


Fig. 7: Schema raffigurante gli ipotetici cambiamenti a cui sono sottoposte le sinapsi in seguito a LTP (tratto da: Sorra et al., 1998).

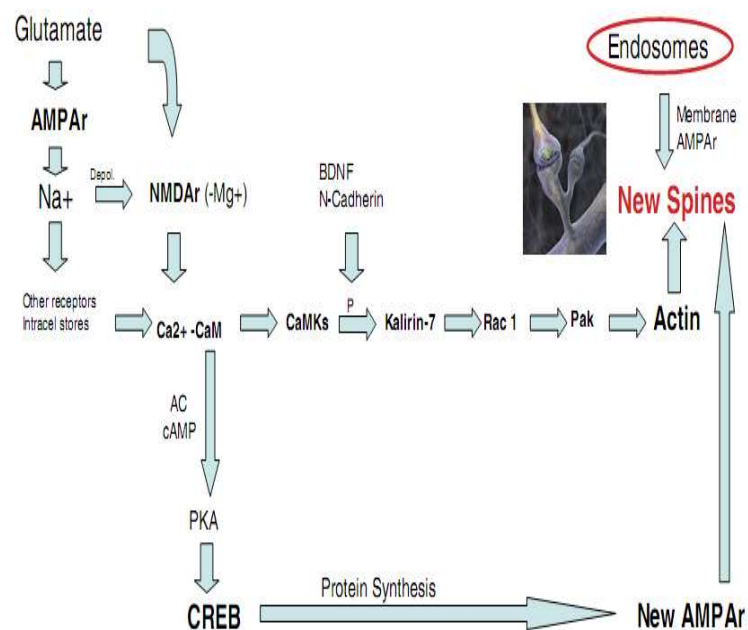


Fig. 8: LTP e nuove spine: sintesi di alcuni meccanismi molecolari che si attuerebbero nel neurone postsinaptico (tratto da: Morgado-Bernal, 2011).

Inoltre, recentemente un recente lavoro di Xu et al., (2009) ha mostrato che la formazione di nuove spine dendritiche nella corteccia motoria

del topo è fondamentale per l'acquisizione e il mantenimento dell'apprendimento motorio.

L'apprendimento esplicito, rispetto a quello implicito, prevede la produzione di un segnale retrogrado che, liberato dal neurone postsinaptico, ha come bersaglio la terminazione presinaptica al fine di mantenere la secrezione del glutammato. Il processo si attiva quando le proteinchinasi calcio-dipendenti su citate cedono un gruppo fosforico all'enzima NO-sintetasi (NOS). Questo enzima per operare come donatore di elettroni, si lega sia alla calciocalmodulina sia a tre coenzimi (NADPH, FAD e FMN; Snyder & Bredt 1992). La NOS così attivata induce l'arginina (un amminoacido) a scindersi in citrullina e ossido d'azoto (NO; Snyder & Bredt 1992; Kandel & Hawkins 1992). Che liberato dal neurone postsinaptico nello spazio extracellulare penetra nella terminazione presinaptica e agisce da messaggero retrogrado legandosi al ferro del gruppo eme della guanililciclasa. L'enzima guanililciclasa attivato da NO induce la formazione di GMP ciclico (Snyder & Bredt 1992) il quale mantiene aperti canali calcio. La conservazione del flusso in entrata degli ioni Ca^{2+} conserva il livello di fusione delle vescicole sinaptiche nella membrana presinaptica e la reiterata liberazione del glutammato nella fessura sinaptica (Snyder & Bredt 1992).

Più recenti evidenze sperimentali ottenute sia negli Invertebrati sia nei Vertebrati suggeriscono che NO abbia un importante ruolo anche nel consolidamento della memoria LT (Matsumoto et al., 2006; Ota et al., 2008).

1.6.2 La memoria a lungo termine

La memoria LT riguarda informazioni ritenute per intervalli di tempo che vanno da alcuni minuti a tutta la vita. In questo modo sono conservate tutte le nostre conoscenze, le esperienze di vario tipo, i ricordi personali, le procedure per fare certi compiti, così come la programmazione di azioni future (De Beni, 2004).

È generalmente riconosciuto che la stabilizzazione a lungo termine di nuove informazioni sia associata all'alterazione fisica della struttura dei neuroni alla quale segue una modificazione dello schema di connessione neurale. È ormai noto che i processi di consolidamento della memoria prevedono la formazione e il mantenimento di riarrangiamenti citoscheletrici che forniscono il substrato strutturale per la memoria LT (Morgado-Bernal, 2011). Queste trasformazioni dipendono da cambiamenti plastici che coinvolgono una sequenza di specifici processi cellulari (Davis & Squire, 1984; Nguyen et al., 1994; Bailey, 1999) che iniziano con l'attivazione del recettore che è associata a cambiamenti a breve termine nell'efficacia sinaptica che si basano sulla fosforilazione e sul riciclo recettoriale; questi cambiamenti precoci sono poi seguiti da alterazioni dell'espressione genica e della sintesi proteica in modo prodromico rispetto alle modificazioni strutturali (Dudai, 2002). Ciò necessita della sintesi di mRNA e la successiva traduzione in proteine. Alcuni dei geni che vengono attivati precocemente (IEGs) sono stati identificati e comprendono geni che regolano la traduzione di altri geni come c-fos, c-jun, zig 268 e Erg-3 e effettori delle IGEs come Arc, Narp, Homer, Cox-2 e Rheb, i quali, agiscono direttamente sulle cellule per promuovere differenti effetti tra cui i cambiamenti plastici.

Pertanto la ricerca si va focalizzando sul problema dell'identificazione delle proteine e degli mRNA coinvolti nei processi di memorizzazione LT.

Le prime evidenze sulla modulazione dell'espressione genica nell'apprendimento LT sono derivate da studi condotti in *Aplysia* e *Drosophila* che hanno portato all'identificazione della via del cAMP - PKA - CREB come via molecolare intracellulare essenziale per il consolidamento della memoria LT (Alberini et al., 2006). Inoltre, in *Aplysia*, è stato evidenziato un ruolo cruciale della clatrina e della tubulina nell'istaurarsi della memoria LT (Barzilai et.al., 1992).

Recenti indagini sono state condotte nella lumaca di stagno *Lymnaea*, da Rosenegger e collaboratori (2010). Questi autori tramite spettrometria di massa, sono andati a valutare la variazione della sintesi proteica in animali sottoposti a *training* di sensitizzazione LT e in animali di controllo. Da questa indagine è emerso che 19 proteine erano sintetizzate ex-novo negli animali sensitizzati, 12 proteine erano presenti solo nei controlli e 21 proteine erano espresse in modo significativamente differente nei sensitizzati rispetto ai controlli. Tra le proteine espresse solo negli animali sensitizzati LT sono state caratterizzate a) l'adenilato ciclasi tipo 8 (AC8), che viene attivata dalla Ca^{2+} -calmodulina, e induce un aumento di cAMP che a sua volta attiva la PKA che è in grado di fosforilare le regioni del promotore che legano il DNA; l'importanza di AC8 negli eventi di memorizzazione LT è stato anche messo in evidenza da un recente studio nel quale sono state prese in considerazioni forme di *working memory* e di apprendimento spaziale nei topi (Zhang et al., 2008); b) l' isoforma ϵ della PKC, che ad esempio nei neuroni ippocampali è in grado di modulare l'attività dei canali Na^+ e il rilascio del neurotrasmettitore (Shiral et al., 2008). Dallo studio di Rossenegger e collaboratori sono emerse anche proteine il cui ruolo non è del tutto chiaro a livello dei processi mnemonici. Un esempio è rappresentato dalla proteina UHRF1 *binding protein*, direttamente coinvolta nel processo di metilazione e replicazione del DNA (Avvakumov et al., 2008). La

metilazione del DNA è uno step importante nella formazione della memoria (vedi oltre) (Miller & Sweatt, 2007), quindi, questa proteina potrebbe essere una delle proteine coinvolte nel riarrangiamento degli istoni quando si instaura la memoria.

Uno studio recente ha identificato fosfoproteine regolate positivamente in seguito a condizionamento pavloviano, nei lisati di sistema nervoso del mollusco marino *Hermissenda*. Queste proteine sono proteine coinvolte nella regolazione trascrizionale, nella segnalazione cellulare, nella regolazione del citoscheletro, e nell'attività metabolica (Crow & Xue-Bian, 2010).

Nei Vertebrati appare sempre più evidente che modificazioni che intervengono a livello della cromatina risultano in meccanismi fondamentali per l'instaurarsi di apprendimento e memoria LT. È stato suggerito che processi epigenetici come la metilazione del DNA, l'acetilazione degli istoni, siano in relazione con la capacità della cellula neurale di essere plasmata dalle esperienze passate (Borrelli et al., 2008). In generale l'espressione genica è regolata dinamicamente da meccanismi di acetilazione e deacetilazione degli istoni (Kouzarides, 2007): l'acetilazione promuove la trascrizione, mentre la deacetilazione regola negativamente la trascrizione. Recenti studi hanno dimostrato nel topo che un bilanciamento dell'attività delle acetiltransferasi degli istoni e delle deacetilasi è fondamentale per la regolazione dell'espressione genica richiesta nei processi di memoria LT (McQuown et al., 2011); addirittura l'inibizione dell'enzima responsabile della deacetilazione degli istoni può trasformare un evento di apprendimento (tests di riconoscimento di oggetti) che di per se' non porterebbe a memoria LT in un evento che può essere ricordato a lungo termine (Stefanenko et al., 2009).

1.7 Precedenti analisi biologico-molecolari su ratti sottoposti a CFC

Per evidenziare meccanismi di regolazione dell'espressione genica e della sintesi proteica nella memoria LT è possibile utilizzare tecniche di trascrittomica, quali il DNA microarray e l'ibridazione sottrattiva soppressiva o SSH, che rispetto ad altre tecniche di trascrittomica ha il vantaggio di riuscire a isolare anche sequenze rare o poco espresse a partire da concentrazioni molto basse di mRNA (1-2 µg) retrotrascritto in cDNA. Tramite questa tecnica, recentemente nei nostri laboratori è stato possibile costruire delle librerie geniche differenziali dalla regione medio-temporale del cervello di ratti sottoposti a CFC.

SSH comprende due ibridazioni sottrattive, seguite da due reazioni di PCR. In figura 9 è rappresentato in modo schematico il protocollo di SSH per la costruzione della libreria *forward*: ci riferiamo con il termine *tester* al cDNA ottenuto dall'mRNA isolato dai cervelli di ratti condizionati e con il termine *driver* al cDNA ottenuto da mRNA isolato dai cervelli di animali *naïve*. Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 2 µg di mRNA di entrambi i campioni ed è stato digerito con l'enzima di restrizione *RsaI*, che produce frammenti *blunt-end*. Il cDNA del *tester* è stato suddiviso in due aliquote ed a ciascuna è stato legato un diverso adattatore: 1R e 2R. Gli adattatori, mancando del gruppo fosfato al 5', si legano solo all'estremità 5' del cDNA. Sono seguite due ibridazioni sottrattive successive. La prima è stata effettuata aggiungendo a ciascun *tester* denaturato, *driver* denaturato in eccesso. Durante questa fase la maggior parte dei trascritti del *tester* non differenziali, si lega al *driver* e la rimanente frazione del *tester*, che rimane a singolo filamento risulta arricchita di sequenze differenzialmente espresse. Inoltre in questo passaggio la concentrazione delle sequenze poco e molto

esprese viene normalizzata, perché, essendo la cinetica di ibridazione di secondo ordine, la riassociazione delle molecole più concentrate è più veloce. La seconda ibridazione è stata effettuata unendo, senza denaturare, i prodotti della prima ibridazione e aggiungendo *driver* denaturato in eccesso.

Durante questo passaggio, oltre ad arricchirsi di sequenze differenzialmente espresse, la frazione a singolo filamento del *tester* 1R ibrida con la stessa frazione nel *tester* 2R, formando una popolazione di sequenze differenzialmente espresse a doppio filamento caratterizzate dal fatto di essere asimmetricamente fiancheggiate dai due adattatori. Questo, insieme all'effetto soppressivo, rende possibile la loro amplificazione selettiva tramite due PCR successive utilizzando *primers* le cui sequenze sono complementari a quelle degli adattatori 1R e 2R (vedere tabella 1).

Tramite questa tecnica sono state ottenute due librerie:

- la **libreria *forward*** contenente i prodotti dei geni che erano stati attivati o modulati positivamente da CFC, ottenuta utilizzando come *tester* il cDNA ottenuto dai ratti sottoposti a CFC e come *driver* il cDNA ottenuto dai ratti *naïve*;

la **libreria *reverse*** contenente i prodotti dei geni inibiti o modulati negativamente da CFC, ottenuta utilizzando come *tester* il cDNA *naïve* e come *driver* il cDNA ottenuto dai ratti sottoposti a CFC.

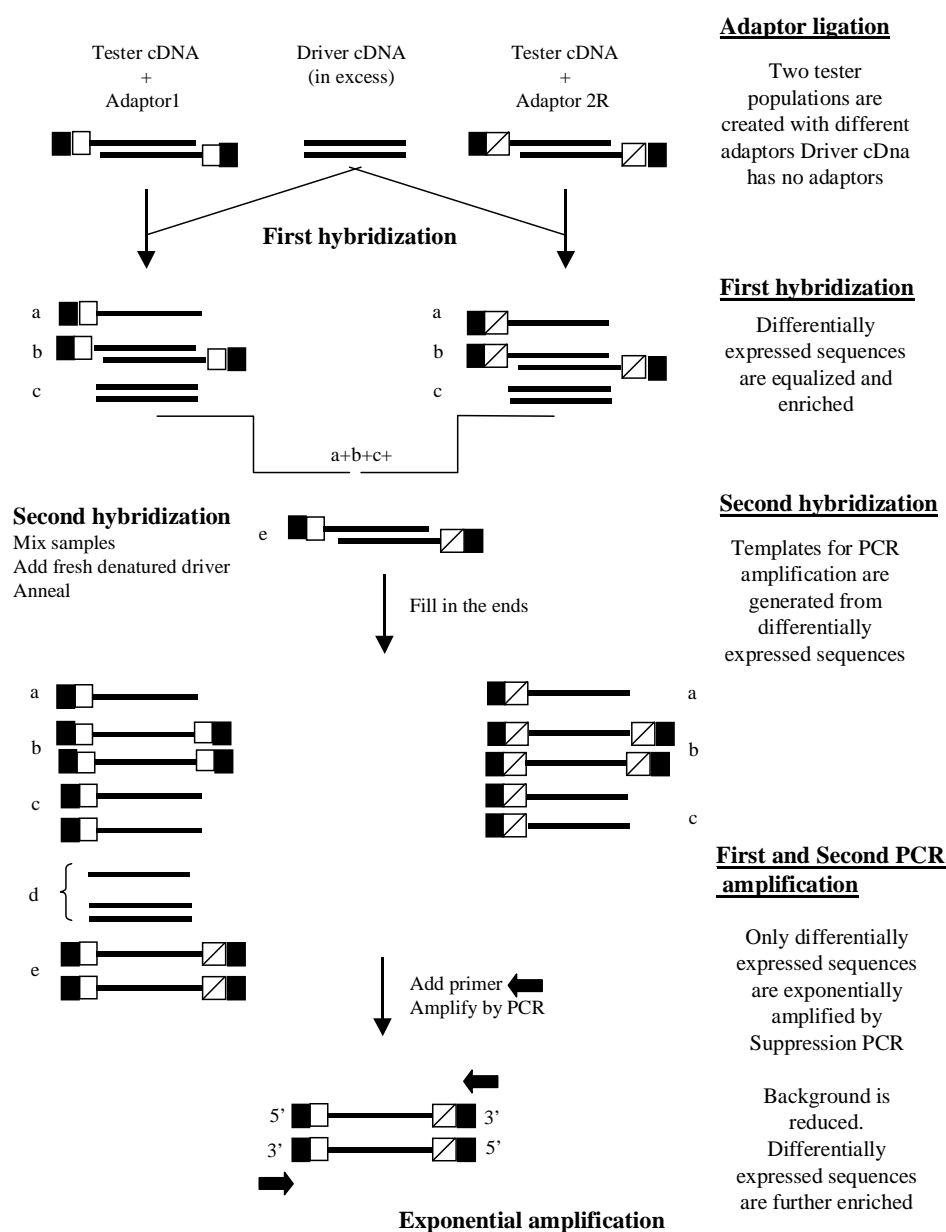


Fig. 9: Schema del protocollo di SSH per la costruzione di librerie differenziali (modificato da: PCR-SELECT™ cDNA Subtraction Kit User Manual)

Successivamente le librerie sono state sottoposte a *screening* primario tramite il quale è stato possibile isolare un *pool* di 20 geni, poi, confermati come veri positivi con la tecnica della PCR Real-time e riportati in tabella 1.

GENI COINVOLTI NELLA MODULAZIONE SINAPTICA			
Clone	gene	E value	Modulazione da parte del CFC
1VH5	complexin 1	0.0	Positiva
2VB10	actin-related protein 3 homolog	$1e^{-151}$	positiva
5ND3	amphiphysin	0.0	Negativa
2VC7	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein alpha	0.0	positiva
5VD5	profilin 2	0.0	positiva
7NB6	stathmin 1	0.0	positiva
GENI COINVOLTI NEL TURN OVER PROTEICO			
1VA11	tripartite motif protein 32	0.0	positiva
1VB12	proteasome maturation protein	$3e^{-178}$	positiva
GENI COINVOLTI NELL'APOPTOSI			
5VD6	caspari 3	$2e^{-134}$	positiva
5VF8	p53 and DNA damage regulated 1	0.0	positiva
GENI COINVOLTI NELL'ATTIVITA' MITOCONDRIALE			
1VA6	ATP synthase 6 mitochondrial	0.0	positiva
4VC12	dynamin 1-like	0.0	positiva
4VF8	translocase of outer mitochondrial membrane 20	0.0	positiva
GENI COINVOLTI NELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE			
1VB9	<i>phosphoprotein enriched in astrocytes 15</i>	$1e^{-170}$	positiva
1VC10	<i>PKA</i> regulatory, type I, alpha	$1e^{-68}$	positiva
2VG1	14-3-3 zeta polypeptide	$3e^{-154}$	positiva
4VC4	<i>TIP41</i>	0.0	positiva
GENI COINVOLTI IN ALTRI PROCESSI CELLULARI			
1VG5	nardilysin	0.0	positiva
5VE10	2,3 bisphosphoglycerate mutase	0.0	positiva
5VH4	RAN, member RAS oncogene family	$4e^{-82}$	positiva

Tab. 1: Elenco dei geni risultati modulati da CFC a 48 h dal condizionamento.

Come si può osservare nella tabella, i geni identificati codificano per proteine che sono coinvolte in varie funzioni cellulari: a) nella modulazione sinaptica, b) nel *turn-over proteico*, c) nel processo apoptotico, d) nell'attività mitocondriale, e) nella trasduzione del segnale e f) in processi cellulari vari.

2. SCOPO DELLA TESI

Nel corso degli ultimi anni sono stati compiuti molti studi allo scopo di chiarire i meccanismi dell'apprendimento e della memoria alla base delle risposte di paura. Da tempo è noto che gli eventi molecolari alla base della memoria a lungo termine coinvolgono la modulazione dell'espressione genica, la sintesi di nuove proteine, la formazione e l'organizzazione di nuovi collegamenti sinaptici.

Recenti ricerche hanno evidenziato il ruolo centrale svolto da alcune vie di trasduzione del segnale durante l'acquisizione delle forme di memoria LT, focalizzando l'attenzione sui fenomeni precoci di espressione genica.

In uno studio precedentemente condotto sono state costruite due librerie geniche differenziali tramite la tecnica dell'ibridazione sottrattiva e soppressiva (SSH) dalle regioni medio temporali di cervelli di ratti sottoposti a CFC e sacrificati a 48 ore dal condizionamento.

Dallo screening primario delle due librerie geniche sono emersi un pool di geni candidati ad essere differenzialmente espressi che, mediante PCR Real-time, sono stati confermati come veri positivi.

Dal momento che l'espressione di questi geni risultava aumentata a 48 h dal condizionamento, è stato possibile ipotizzare un loro coinvolgimento nei meccanismi alla base della memoria LT. Pertanto, scopo del presente lavoro è stato quello di:

- a) valutare la variazione di espressione di questi geni anche a 72 h, 10 e 20 g dal condizionamento;
- b) verificare se la modulazione positiva dell'espressione genica si traducesse in un aumento della sintesi della proteina codificata;
- c) evidenziare a livello delle aree poste nella porzione medio-temporale del cervello di ratti condizionati la presenza di una maggiore quantità di proteina.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Animali

Sono stati utilizzati ratti del ceppo *Wistar* albinici, maschi, dell'età di circa 80 giorni, di peso corporeo medio di 340 grammi. Per aumentare la variabilità genetica del campione, sono stati presi in esame ratti non appartenenti alla stessa nidiata. Gli animali sono stati stabulati singolarmente in gabbie di acciaio inossidabile poste in una stanza nella quale l'illuminazione seguiva il normale ciclo giornaliero luce-buio, e la cui temperatura era mantenuta costante a 20 ± 1 °C. I ratti avevano sempre libero accesso al cibo e all'acqua. 15 animali sono stati sottoposti a *contextual fear conditioning* e 5 di essi sacrificati a 72 ore, 5 a 10 giorni e 5 a 20 giorni. Come controllo sono stati utilizzati 5 ratti (*naïve*), mai entrati nell'apparato di condizionamento.

3.2 Procedura di condizionamento

Gli animali sono stati condizionati in una *Skinner box* (*Modular Operant Cage, Coulbourn Instruments Inc*) (Fig. 10), di dimensioni 29 x 31 x 26 cm, il cui soffitto e due lati paralleli erano costituiti da pannelli di alluminio; gli altri due lati, di cui uno apribile, per consentire l'ingresso dell'animale, erano di plastica trasparente. Il pavimento era composto da barrette di acciaio inossidabile, connesse con degli elettrodi per fornire scosse elettriche durante il *training* di condizionamento (*Grid Floor Shocker, Coulbourn Instruments Inc., Model E13-08*). L'apparato è stato connesso ad un sistema per programmare durata e numero degli stimoli (Scatola di comando Arco 2340 – Ugo Basile). L'apparato è stato posto in una cabina acusticamente isolata (3.5 x 1.8 x 2.1 m), mantenuta a una temperatura

costante di $20 \pm 1^\circ \text{C}$. Nella stanza l'intensità dell'illuminazione era di 60 lux.

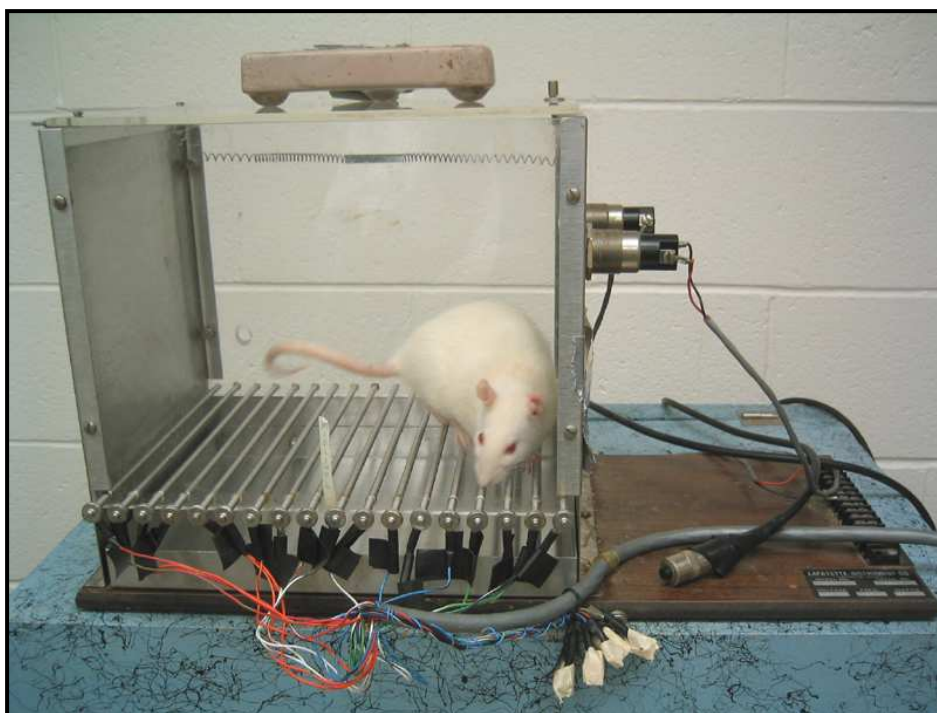


Fig. 10: Rappresentazione dell'apparato di condizionamento. Spiegazione nel testo.

I ratti sono stati sottoposti al test del CFC tra le ore 10.00 e le ore 13.00 per ridurre le influenze circadiane. Ciascun animale è stato prelevato manualmente dalla gabbia di stabulazione, posto in un contenitore di plastica a pareti opache e trasportato dalla stanza di stabulazione nella cabina di condizionamento. Il ratto veniva introdotto nell'apparato di condizionamento (CS), dove aveva luogo la seduta di addestramento che durava in totale di 8 minuti: nei primi 3 minuti, l'animale veniva lasciato indisturbato (Fig. 11A), terminato questo periodo di esplorazione libera, al ratto veniva somministrato uno stimolo US consistente in una serie di 7 scosse elettriche ciascuna della durata di 1s, ad intensità di 1mA, intervallate 30s l'una dall'altra (Fig. 11B). Dopo 2 minuti dal termine della stimolazione, gli animali venivano riportati nella propria gabbia di stabulazione (Fig. 11C). Nelle ore e nei giorni successivi, gli animali sono stati nuovamente portati e mantenuti

per 2 minuti nella gabbia di condizionamento senza subire scosse elettriche. In questi due minuti e nei 2 minuti successivi al protocollo di condizionamento sono state osservate le risposte di *freezing* mediante una telecamera a circuito chiuso situata nella stanza e valutato il tempo in cui l'animale stava in condizione di *freezing*.

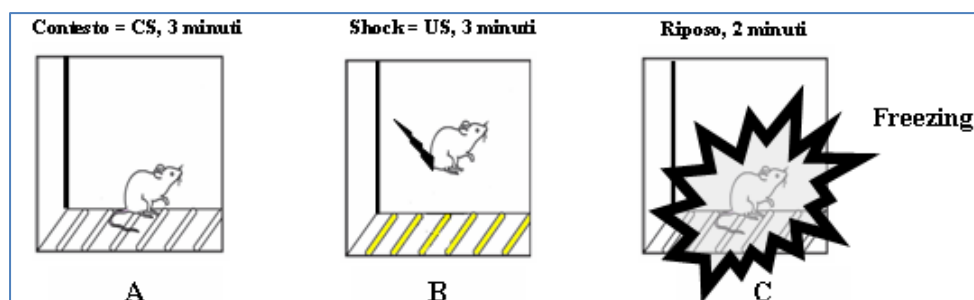


Fig. 11: Schema del protocollo di condizionamento utilizzato.

3.3 Isolamento e conservazione dei tessuti

Tutti gli animali sono stati sacrificati tramite decapitazione, dopo essere stati anestetizzati con etere. Il cervello è stato rimosso dalla scatola cranica, e costantemente mantenuto bagnato da soluzione fisiologica molto fredda. La bassa temperatura, oltre a rallentare i processi ossidativi, rende il tessuto nervoso più consistente. Si procedeva quindi alla dissezione, in condizioni sterili e sotto cappa microbiologica a flussi laminari, per ottenere porzioni di cervello comprendenti le strutture medio-temporali come indicato in Fig. 12.

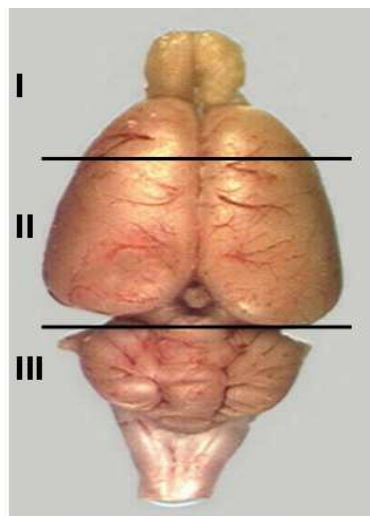


Fig. 12: sezioni operate sul cervello dei ratti, frontale (I), medio-temporale (II) e cerebello-bulbare (III).

Tutte le porzioni di tessuto ottenute sono state poste in *criovials*, istantaneamente congelate in azoto liquido e stoccate a -80°C per i successivi esperimenti.

3.4 Analisi trascrizionale

3.4.1 Estrazione dell'RNA totale

I campioni di tessuto cerebrale sono stati immersi in una soluzione buffer in rapporto 1:20 contenente guanidina tiocianato 4 M, N-lauryl sarcosina 0,5%, citrato di Na 25mM a pH 7, β -mercapto etanolo 0,1M e sottoposti ad omogenizzazione mediante disgregazione meccanica con Ultra-Turrax® T8 (OPTO-LAB INSTRUMENTS). Successivamente l'omogenato ottenuto è stato ultracentrifugato in cloruro di cesio 5,7 M e sodio acetato 25 mM, pH 6,4 per 24 h circa per ottenere la separazione fisica tra surnatante, contenente principalmente polisaccaridi, e pellet traslucido contenente acidi nucleici. Il pellet

ottenuto è stato solubilizzato in H_2O RNAsi *free* (per evitare una eventuale degradazione dell'RNA) in ghiaccio a 4° C. In seguito è stata indotta la precipitazione dell'RNA con 0,1 volumi di AcNa 3M e 2,2 volumi di EtOH assoluto freddo. I campioni di RNA sono stati purificati mediante 3 cicli di centrifugazione a 12.000 rpm, letti allo spettrofotometro per valutare la concentrazione di RNA ottenuto (esempio in Fig. 13) e quindi conservati alla temperatura di -80° C per le analisi successive.

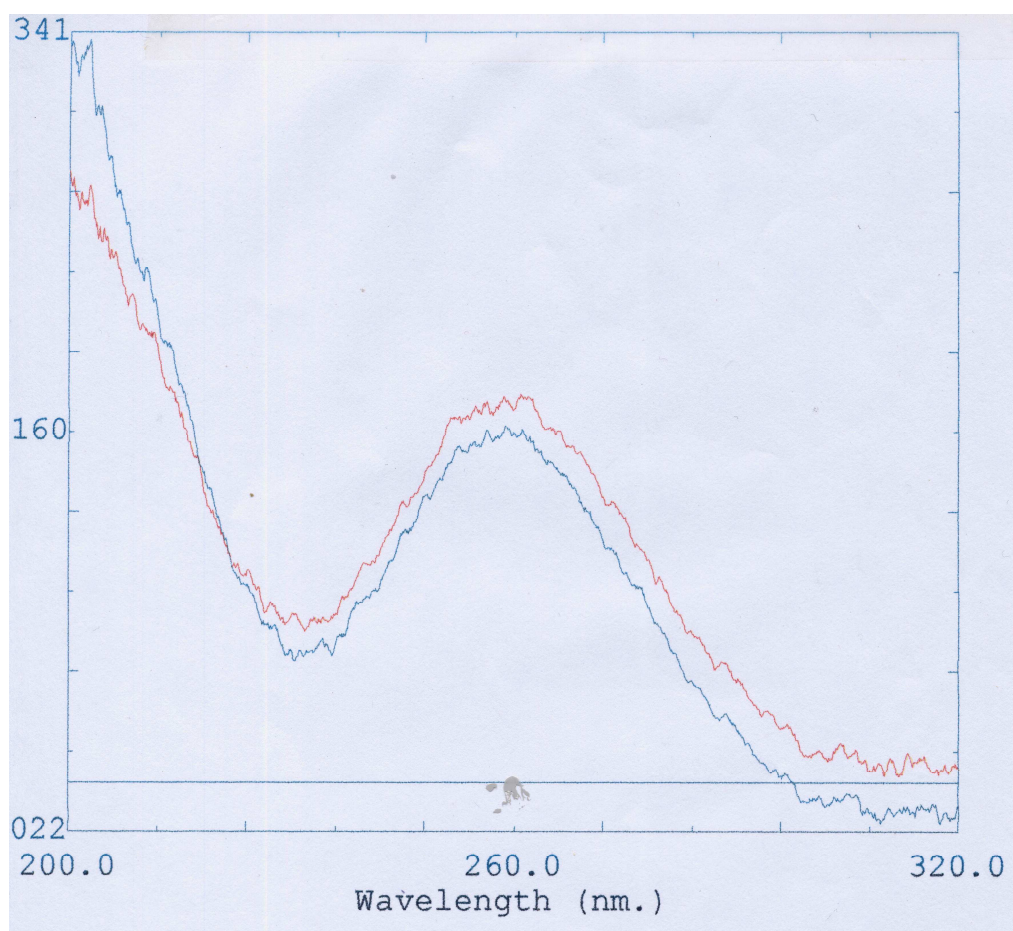


Fig. 13: Esempio di lettura spettrofotometrica di RNA di ratto. 1 μ l di RNA è stato caricato nella cuvetta e letta l'assorbanza a 260 e 320 nm. La concentrazione dell'RNA è stata ottenuta applicando la formula: $[(A_{260} - A_{320}) \times 40 \times (\mu\text{l totale} / \mu\text{l campione})] / 1000$ ed espressa in γ/λ . RNA di buona qualità devono avere $A_{280}/A_{260} > 1,7$.

3.4.2 Retrotrascrizione dell' RNA in cDNA

Preventivamente, l'RNA è stato trattato con DNAsi Kit Sigma per eliminare l'eventuale contaminazione da DNA. La retrotrascrizione è stata effettuata utilizzando il kit iScript Select (Bio-Rad, Milano) che contiene: Acqua RNAsi-free, 5 X iScript buffer di reazione, *random* primer e iScript reverse transcriptasi ed effettuando cicli al termocicizzatore secondo il seguente schema:

- I. ciclo a 25° C per 5 min
- II. ciclo a 42° C per 30 min
- III. ciclo a 85° C per 5 min
- IV. ciclo a 4° C ∞

Per valutare l'avvenuta retrotrascrizione, il cDNA è stato amplificato utilizzando primers della subunità 18s. e il seguente protocollo di PCR:

7 min a 94° C , per la denaturazione del DNA

30 sec a 94° C	}	ripetuti per 30 cicli per l'amplificazione
40 sec a 55° C		
50 sec a 72° C		

7 min a 72° C per l'inattivazione della polimerasi

∞....4° C per la conservazione

La *master mix* utilizzata conteneva: H₂O, DNA stampo 0.25-1 µg/µl, Buffer 1X, MgCl₂ 1,5 mM, dnTP 0,4 mM, Primer1 + Primer2 0,5 µl, Taq EURO 0.05 u/µl

3.4.3 Analisi di espressione dei geni mediante PCR *Real-Time*

La PCR Real-Time è stata eseguita con il kit SYBR Green on MiniOpticon Two-Color Real-time PCR detection system (Bio-Rad, Milano). I primers utilizzati stati costruiti utilizzando il software *Beacon Designer 7* (Biorad Milano). I *primers forward* e *reverse* sono stati scelti per ibridare una unica regione specifica dell'appropriata sequenza genica e sono indicati in tabella 2.

Nome del gene	Primer	Numero di accesso
	F: Forward R: Reverse	
Subunità 6 della ATPsintasi	F: ATGGGGAAGAAGCCCTAGAA R: CCTCTTTCATTACCCCCACA	AC_000022.1
Tripartite motif protein 32	F: CGAAGCCCACATAATCCAAT R: CACAAAGTCCCTTTGGGAAG	NM_001012103.1
Phosphoprotein enriched in astrocytes 15	F: CAGGCAGGACTAGGGAGACTT R: AAACATTGCATTTACATTTGAGC	NM_001013231.1
Proteina di maturazione del proteasoma	F: CTCGCCCATCAGTTCACCTT R: TCTCCGGAAAGGGTTTTCTT	NM_025624.1
PKA sub unità regolatoria tipo I α	F: AAAGTGTGGGTTATCATTGGAA R: GGCTCCAGAGAGAAGGGAAT	NM_021880.2
Complessina 1	F: AAGGGACTCCAAGTGTGTCG R: GAAATGAGCAGTGGGTGCTT	BC093605.1
Nardilisina	F: GAGCGGATGAATCTGAGGAGGAG R: TTTGATGTATCGGTACTGCTTGGG	NM_012993.1
Proteina 3 correlata all'actina	F: CATTGTCCTCTCTGGTGGTCAAC R: CTCAACTTCAGCCTGGCATCTAC	NM_031068.1
TIPRL, TOR signalling pathway	F: CAGAGCAGCCACCAGGACTTC R: AGGGCATCCGTAGCATTGAACTC	XM_001075447.1

regulator-like		
α -SNAP	F: CAGTCCCCTCCTCAAGTACAGC R: TCCTCATACTTCTGAACAGCAAGC	NM_080585.1
dynamin 1-like	F: CAACCTGACGCTTGTGGATTACC R: CAGCAGTGACAGCAAGGATAATG	NM_053655.2
Translocase of outer mitochondrial membrane 20	F: TACAACAGACTCTTCCACCACCAG R: CATTCCACATCATCCTCAGCCAAG	BC078715.1
14-3-3 isoforma zeta	F: AGGCTTGGAGCACTTGTGAG R: GTGAACCGTTTCTGCCCTTA	BC070941.1
Profilina 2	F: GCAGCCTCTCCCATCTACCT R: ACCCTTGGAATCATGACAG	NM_030873.1
2,3-bifosfoglicerato mutasi	F: ACGACCAGGAGCAAGCAGAG R: AAATCAAACGGGAGGAGCAGAAG	NM_199382.1
member RAS oncogene family	F: AGCCGCAGGTCCAGTTCAAG R: TGATGGGTCCTCTGTTGGTATG	NM_053439.1
Anfifisina	F: GACCCACTCACCCATGTCTC R: AAATCAGTGCTTGTCGTCCA	NM_175007.1
Caspasi 3	F: GCTGTCAGTCAGAGCGTAAG R: CACAAGGTGGGTCCAACACTAGC	NM_012922.2
Translocase of outer mitochondrial membrane 20	F: CTCTCAGACAAGCGGCAGATTG R: TGTTCCTCAAAGCAAACCATCACG	BC078715.1
Statmina 1	F: GTGCTGTATTGACTGTGGAAGAC R: AGAATTGGGATCGCAAAGTGAAC	NM_017166.1
G3PDH	F: CTACCCACGGCAAGTTCAAC R: CCAGTAGACTTCCACGACATAC	

Tab. 2: Elenco dei primers utilizzati.

Per la reazione di PCR sono stati utilizzati: 1 μ g/ μ l cDNA, 300 nM di ciascun *primer*, mastermix iQ Sybr Green Supermix (200 μ M dNTP, 5 mM MgCl₂, 3.75 U iTaq™ DNA Polimerasi) e H₂O RNase-free per portare la mistura di reazione al volume di 15 μ l.

La PCR è stata eseguita in due step, uno a 95°C per 3 minuti e uno a 95°C per 10 secondi e a 59°C per 60 secondi ripetuto 40 volte. La fluorescenza è stata letta durante la reazione, seguendo il monitoraggio in continuo della quantità di prodotti di PCR. Preventivamente è stata valutata l'efficienza di amplificazione dei *primers* secondo il protocollo indicato dalla ditta.

Dopo l'amplificazione mediante l'analisi della curva di *melting* è stato confermato che il segnale ottenuto corrispondeva ad un unico amplicone.

Ciascun gene *target* è stato caricato insieme alla gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (G3PDH), utilizzato come gene di controllo espresso costitutivamente.

La valutazione relativa dei cambiamenti nell'espressione è stata effettuata tramite il metodo del $2^{-\Delta\Delta C_T}$ normalizzando i livelli di espressione di ciascun gene *target* rispetto al gene di G3PDH (Livak & Schmittgen, 2001). Questo metodo presuppone che entrambi i geni, siano amplificati con un'efficienza vicina al 100% e che la differenza delle loro efficienze non sia inferiore al 5%.

L'incremento o il decremento di espressione è stato determinato rispetto a un controllo dopo normalizzazione a G3PDH. Tutte le reazioni sono avvenute in triplicato e i dati sono stati rappresentati nei grafici come medie \pm E.S.

3.5 Western-blot

L'analisi con Western-Blot è stata condotta su proteine estratte da 3 campioni per ogni condizione sperimentale. Le porzioni di cervello di ratti CFC e di ratti *naive* contenenti le aree medio-temporali sono state omogenizzate con omogenizzatore *Ultra-Turrax*, in 10 ml di *buffer* di lisi (EDTA 1 mM, TRITON x-100 0,5%, NaF 5mM, Urea 6M, Na-

ortovanadato attivato 1mM, Na-pirofosfato 2,5 mM). L'omogenato proteico è stato incubato a temperatura ambiente per 1 ora e poi centrifugato a 4°C per 30 minuti a 4000 g per ottenere una divisione fisica in precipitato e surnatante. Le proteine del surnatante sono state utilizzate per rilevare la statmina I, la profilina 2 e l'anfifisina I. La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo di Bradford con sieroalbumina bovina usata come standard.

Aliquote di ciascun campione contenenti una uguale quantità di proteine sono state sottoposte a SDS-Page 12% (*Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). G3PDH è stata usata come controllo.

Nei gel sono stati caricati 60 µg di proteine per ciascun pozzetto e un *marker* di peso molecolare noto per monitorare sia la corsa elettroforetica che il successivo trasferimento delle proteine su membrana. La corsa elettroforetica è stata eseguita nell'apposita cameretta (*Bio-Rad Mini PROTEAN 3 system*) contenente *electrode buffer* (TRIS 3 gr, SDS 1 gr, Glicina 14,14 gr e H₂O.) in presenza di una corrente di 200 V. Al termine della separazione elettroforetica (circa 45 minuti) sia il gel che la membrana di nitrocellulosa (*Amersham Biosciences*, Milano, Italia), sono stati equilibrati nel *blotting buffer* (TRIS 3 gr, Glicina 14,14 gr, Metanolo 200 ml e H₂O). Il trasferimento è stato eseguito a 90 V per 60 minuti mantenendo la cameretta in ghiaccio per evitare il surriscaldamento del campione.

Per verificare la buona riuscita del trasferimento delle proteine dal gel alla membrana, il gel è stato colorato con *Bio-Safe Coomassie* (Blu di Coomassie 0,02%, Metanolo 50%) e poi decolorato con metanolo al 50%; la membrana, invece, è stata colorata con rosso *Ponceau* (0.1% *Ponceau S*, 0.5% acido acetico) per visualizzare le bande e il marker di peso molecolare.

Le membrane sono state prima sottoposte ad un rapido lavaggio in PBS e poi a tre lavaggi, ciascuno di 10 minuti, in PBS-0,05% Tween 20. Successivamente sulle membrane sono stati bloccati tutti i siti di legame che potevano interferire con il successivo legame degli anticorpi specifici per le proteine da analizzare con una soluzione contenente latte in polvere al 1% (*Gogo* in PBS 0,05% + Tween 20) per 3 ore su un oscillatore orizzontale. Dopo ulteriori quattro lavaggi, le membrane sono state incubate a 4° C *over night* con gli anticorpi primari specifici opportunamente diluiti. Gli anticorpo primari per statmina I, profilina 2 e amfifisina I (*Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA*) sono diluiti 1:200 in PBS 0,05% + Tween20. Per G3PDH l'anticorpo primario (*Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA*) è stato diluito 1:500 in PBS 0,05% + Tween20.

Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, le membrane sono state sottoposte ad un rapido lavaggio in PBS, a tre lavaggi in PBS 0,05% + Tween20 ciascuno di 10 minuti e poi incubate con l'anticorpo secondario diluito 1:1000 in PBS 0,05% + Tween20 a temperatura ambiente per 2 ore.

Dopo l'incubazione con l'anticorpo secondario, le membrane sono state nuovamente lavate con PBS-0,05% Tween20. La rilevazione delle specifiche bande proteiche è stata effettuata mediante chemiluminescenza utilizzando il *Kit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrat* (Rockford, IL, USA) seguendo le istruzioni fornite dalla ditta.

Le membrane ibridate con gli anticorpi della proteina da quantificare, sono state sottoposte a strippaggio (soluzione di strippaggio SDS 2%, TRIS-HCl pH 6,8 0,5 M) e ibridate poi con l'anticorpo per la G3PDH. Le lastre radiografiche sono state scannerizzate tramite il sistema di analisi dell'immagine *UVP Image Store 5000*. La densità ottica delle bande è stata misurata tramite il programma *Quantity One®*

Software (Bio-Rad, Milano, Italia). I dati sono stati normalizzati ai livelli di G3PDH e espressi come medie di quattro esperimenti indipendenti.

3.6 Immunofluorescenza su *slices* di ippocampo

I ratti sono stati anestetizzati e perfusi per via caridaca con paraformaldeide al 4% in 0.1 M tampone fosfato (PB) freddo. I cervelli sono stati rimossi e post-fissati in paraformaldeide al 4% in 0.1 M tampone fosfato (PB) a 4° C per 6 ore, e trasferiti in una soluzione di saccarosio al 25% in PB contenente sodioazide allo 0,01% a 4° C. I cervelli sono stati sezionati al criostato (CRIOSTAT, Leica 2155) a 20 µm. Le fettine ottenute sono state montate su vetrino portaoggetto rivestito con gelatina, quindi risciacquate in 0.1 M PB e incubate con anticorpo primario 1:500 per 48 h (rabbit anti-stathmin; Calbiochem) diluito in 0.1 M PB contenente 0,3% Triton X-100 a 4° C. Le fettine sono state poi risciacquate in PB 0.1 M e incubate *overnight* in anticorpo secondario coniugato con Alexa Fluor 488 a una diluizione di 1:200 in 0.1 MPB contenenti 0,3% Triton X-100. Esperimenti di controllo sono stati eseguiti per garantire che gli anticorpi secondari reagissero solo con il complesso appropriato antigene-anticorpo, le fettine sono state incubate *overnight*, solo, in anticorpo secondario coniugato con Alexa Fluor 488 a una diluizione di 1:200 in 0.1 MPB contenenti 0,3% Triton X-100. Infine, le fettine sono state sciacquate in PB 0.1 M, e i vetrini coprioggetti montati tramite una miscela 0.1 M PB-glicerina. Le fettine sono state esaminate con un microscopio a immunofluorescenza (Nikon) utilizzando ingrandimenti $\times 20$ e $\times 40$. Le immagini sono state elaborate con Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems, Inc., Mountain View, CA, USA). Il pacchetto software IMAGE J (National institutes of Health, Bethesda, MD, USA) è stato

utilizzato per determinare l'intensità media dei pixel (scala di grigio) dei singoli campi nello strato granulare del giro dentato. All'interno di ogni campo, il contributo delle porzioni non marcate è stato rimosso, normalizzando i dati di fluorescenza di fondo. I valori di intensità media di ogni campo sono stati espressi come percentuale della intensità di fluorescenza media del campo corrispondente di fettine di ippocampo di animali di controllo.

3.7 Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati ottenuti con il metodo $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (vedi paragrafo 2.4.3) è stata eseguita tramite il test ANOVA e il Tukey post-hoc test.

L'analisi statistica dei dati densitometrici è stata effettuata tramite il *t test per dati non appaiati*.

La significatività è stata posta a $p < 0,05$. L'analisi statistica è stata effettuata con il software PRISM (versione 4.0, *Graph Pad Software Inc.*, San Diego, CA).

4. RISULTATI

4.1 Contextual fear conditioning

Il paradigma di condizionamento usato è quello riportato nei Materiali e Metodi (vedi paragrafo 3.2) in accordo con quanto descritto precedentemente da Sacchetti et al. (2001, 2004). La figura 14 mostra gli istogrammi ottenuti considerando il tempo trascorso dall'animale in condizione di *freezing* nei 3 minuti in cui è stato nuovamente inserito nella gabbia di condizionamento in tempi successivi al condizionamento (72 h, 10 e 20 giorni) e subito dopo il protocollo di condizionamento (tempo 0). Tali dati sono espressi come percentuale di *freezing* rispetto al tempo totale di permanenza nella gabbia di condizionamento.

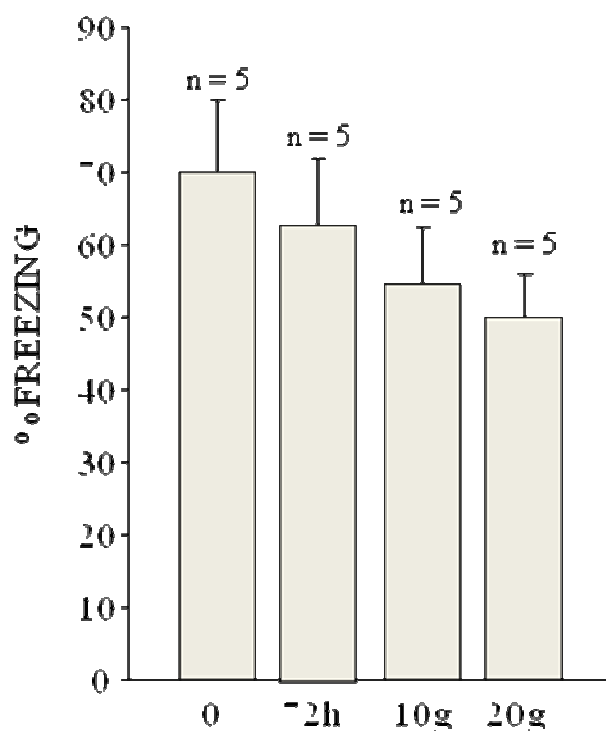


Fig. 14: Gli istogrammi mostrano l'avvenuto condizionamento e il perdurare del condizionamento nei ratti sottoposti a CFC. Sull'asse delle ordinate sono riportati i valori in percentuale di *freezing* e sull'asse delle ascisse il tempo a cui è avvenuta l'osservazione.

Come si può osservare dopo il condizionamento e nei tempi successivi presi in considerazione gli animali hanno mostrato un lungo periodo di *freezing*, che va da circa il 70% al tempo 0, al 50% dopo 20 giorni. Tale periodo è molto superiore al 10% di *freezing* che si osserva negli animali durante la prima fase di esplorazione e negli animali naive che non sono mai entrati nella gabbia di condizionamento per essere condizionati, come riportato da Sacchetti et al., (2001).

4.2 Espressione genica valutata a diversi tempi dal condizionamento nei ratti sottoposti a CFC

4.2.1. Geni coinvolti nella modulazione sinaptica

La modulazione sinaptica si attua attraverso meccanismi che risiedono sia nel terminale pre- che in quello postsinaptico. A livello presinaptico è fondamentale la modulazione del rilascio delle vescicole sinaptiche. La loro liberazione è un evento che coinvolge varie proteine con funzioni altamente specifiche che rendono questo processo rapido, estremamente regolato e plastico (Chen et al 2002; Yoon et al 2008).

L'analisi dei geni differenzialmente espressi in seguito a CFC precedentemente condotta aveva mostrato che a 48 ore dal condizionamento (48 h) i geni codificanti per complessina I, *N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein alpha* (NAPA), profilina 2 (proteine coinvolte nell'esocitosi del neurotrasmettitore), *actin-related protein 3 homolog* (ARP3) e statmina I (Stat I) (proteine coinvolte nell'assemblaggio dei filamenti di actina) erano modulati positivamente da CFC mentre il gene di anfisina I (proteina coinvolta nell'endocitosi delle vescicole) era modulata negativamente.

Negli istogrammi di figura 15 è riportata l'espressione dei geni per complessina I (Fig. 15A), NAPA (Fig. 15B) e profilina 2 (Fig. 15C) ottenuta con RT-PCR Real Time e misurata con il metodo del $\Delta\Delta C_t$ a

72 ore (72 h), 10 (10 g) e 20 (20 g) giorni dal condizionamento messi a confronto con il dato ottenuto a 48 ore. I dati derivano da un'analisi in triplicato su cDNA estratto da 5 ratti di controllo (naive) e 5 ratti sottoposti a CFC (CFC) per ogni tempo, utilizzando come controllo interno la gliceraldeide 3-P deidrogenasi (G3PDH). Si osserva come: il gene di complexina I (Fig. 15A) ai tempi successivi alle 48 ore (CFC: 1.340 ± 0.053 , naive: 1.000 ± 0.046) sia espresso in misura minore e statisticamente significativa nei ratti CFC rispetto ai controlli (CFC: 0.457 ± 0.023 a 72 h, 0.390 ± 0.04 a 10 g e 0.280 ± 0.038 a 20 g; naive: 1.000 ± 0.186 a 72h, 1.000 ± 0.213 a 10g e 1.000 ± 0.049 a 20g ; ANOVA, $F = 62,93$, $p < 0,001$; Tukey post-hoc test $p < 0,001$ per tutti i tempi considerati). Il gene di NAPA (Fig. 15B) è risultato espresso a livelli costitutivi a 72 ore (CFC: $1,241 \pm 0,145$, naive: $1,000 \pm 0,268$; ANOVA $F_{1,28}=16,37$, $p < 0,001$; Tukey post-hoc test $p > 0,05$) e espresso in misura significativamente inferiore a 10 e 20 giorni (CFC: $0,258 \pm 0,022$ a 10g e $0,316 \pm 0,115$ a 20g; naive: $1,000 \pm 0,470$ a 10g e $1,000 \pm 0,516$ a 20g; Tukey post-hoc test $p < 0,01$ e $p < 0,05$ rispettivamente) e il gene di profilina 2 (Fig. 15C) è risultato espresso in misura significativamente maggiore sia a 72 ore sia a 10 giorni ((ANOVA $F_{1,28} = 81,57$, $p < 0,001$; Tukey post-hoc test $p < 0,001$ e $p < 0,01$ rispettivamente), mentre a 20 giorni è risultato essere espresso in modo significativamente inferiore ai livelli costitutivi (Tukey post-hoc test $p < 0,001$).

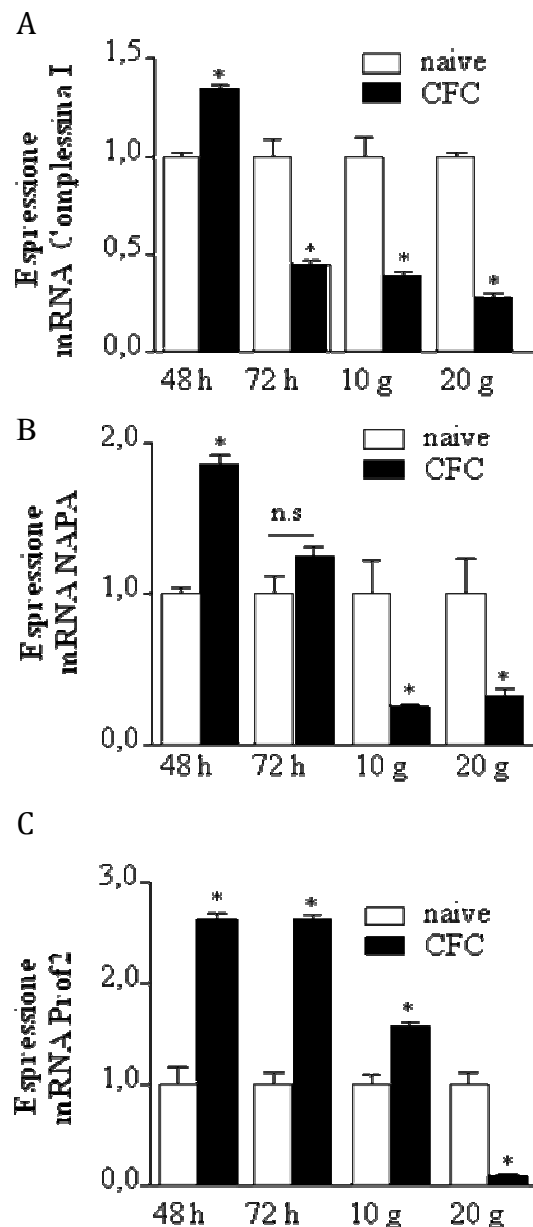


Fig. 15: Livelli di espressione di complessina I, NAPA e profilina 2.

In questi grafici e in quelli delle figure seguenti i dati sono stati ottenuti con la formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ e sono mostrati come medie \pm E.S. (A) Si noti come il gene per complessina I che a 48 h dal condizionamento era espresso in modo significativamente maggiore mostri invece un decremento di espressione significativo rispetto ai livelli costitutivi a 72 h, 10 g e 20g; (B) il gene di NAPA dopo l'incremento di espressione registrato a 48 h ritorna ai livelli costitutivi a 72 h per poi portarsi al di sotto dei livelli costitutivi a 10 e 20 g; (C) Il gene di profilina 2 (Prof 2) mostra una maggiore espressione statisticamente significativa rispetto ai livelli costitutivi fino a 10 g per poi scendere al di sotto dei livelli costitutivi a 20 g. * indica $p < 0,05$, Tukey post-hoc test.

Gli istogrammi di figura 16 mostrano l'espressione dei geni per ARP3 (Fig. 16A) e statmina I (Fig. 16B). Per ARP3 si osserva che, ai tempi successivi alle 48 h (CFC: $1,64 \pm 0,06$, naive: $1,000 \pm 0,05$)

l'espressione genica è significativamente maggiore rispetto ai controlli (naive) a 72 h, per poi tornare a 10 g ai livelli costitutivi ed infine a 20 g assumere valori statisticamente inferiori a quelli costitutivi (CFC: $2,1 \pm 0,07$ a 72 h, $1,03 \pm 0,14$ a 10 g e $0,2 \pm 0,02$ a 20 g; naive: $1,000 \pm 0,12$ a 72 h, $1,000 \pm 0,2$ a 10 g e $1,000 \pm 0,07$ a 20 g; ANOVA $F = 28,17$ $p < 0,0001$ e Tukey post-hoc test $p < 0,001$, $p > 0,05$ e $p < 0,001$ rispettivamente). Il gene di statmina I (Stat I) mostra un aumento di espressione statisticamente significativo rispetto ai controlli (naive) fino a 10 g, per poi scendere al di sotto dei livelli costitutivi a 20 g (CFC: $2,03 \pm 0,11$ a 48 h, $2,67 \pm 0,05$ a 72 h, $1,67 \pm 0,3$ a 10 g e $0,15 \pm 0,02$ a 20 g; naive: $1,000 \pm 0,09$ a 48 h, $1,000 \pm 0,15$ a 72 h, $1,000 \pm 0,22$ a 10 g e $1,000 \pm 0,04$ a 20 g; ANOVA $F = 36,59$, $p < 0,001$ e Tukey post-hoc test $p < 0,001$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ rispettivamente).

Gli istogrammi di figura 17 mostrano l'espressione del gene per anfifisina I (AMPH I): a 48 h (CFC: $0,43 \pm 0,08$, naive: $1,000 \pm 0,078$) la sua espressione è significativamente inferiore rispetto ai livelli costitutivi, a 72 h e a 10 g è significativamente maggiore rispetto ai controlli (naive), per ritornare a 20 g ad assumere valori statisticamente inferiori a quelli costitutivi (CFC: $3,01 \pm 0,56$ a 72 h, $2,19 \pm 0,07$ a 10 g e $0,22 \pm 0,006$ a 20 g; naive: $1,000 \pm 0,172$ a 72 h, $1,000 \pm 0,14$ a 10 g e $1,000 \pm 0,069$ a 20 g; ANOVA $F = 16,94$, $p < 0,0001$; Tukey post-hoc test $p < 0,001$ a 72 h, $p < 0,05$ a 10 g e $p < 0,05$ a 20 g).

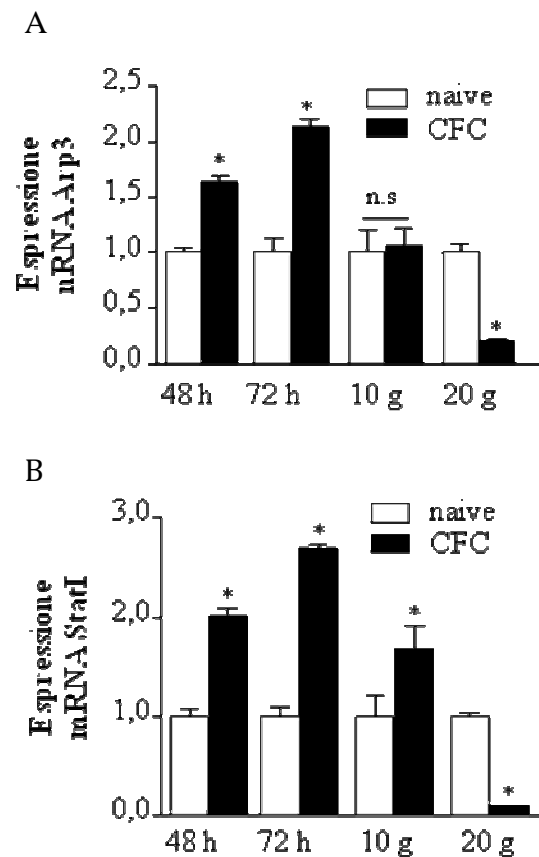


Fig. 16: Livelli di espressione di ARP3 e statmina I

(**A**) Si noti come il gene di ARP 3 a 72 h dal condizionamento mostri un aumento significativo di espressione rispetto a 48 h ($p < 0,05$ Tukey post-hoc test), per poi riportarsi a 10 g ai livelli costitutivi e a 20 g scendere al di sotto di tali livelli. (**B**) Il gene di statmina I (Stat I) mostra un aumento dell'espressione statisticamente significativo a 72 h rispetto a 48 h ($p < 0,001$, Tukey post-hoc test), a 10 g, rimane maggiormente espresso rispetto ai livelli costitutivi per poi portarsi a 20 g al di sotto di tali livelli. * indica $p < 0,01$, Tukey post-hoc test

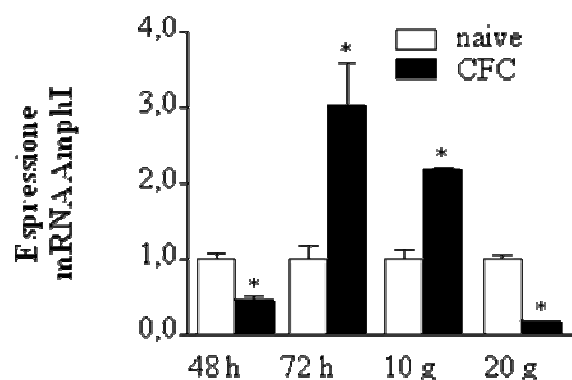


Fig. 17: Livelli di espressione di amfifisina I.

Si noti come l'espressione del gene di amfifisina I (Amph I) che dopo 48 h dal condizionamento risultava significativamente minore rispetto ai valori costitutivi, a 72 h e fino a 10 g risulti significativamente maggiore per portarsi a 20 g al di sotto dei livelli costitutivi. * indica $p < 0,05$, Tukey post-hoc test

4.2.2. Geni coinvolti nel *turn-over* proteico

Il turn over proteico è il processo che garantisce la degradazione delle proteine in tutti i tessuti cellulari. Questo meccanismo si realizza soprattutto tramite il sistema ubiquitina proteosoma (UPS), dove l'ubiquitina marca la proteina da degradare per poi essere riconosciuta dal proteosoma. La degradazione proteica regolata dall'UPS si verifica sia durante il consolidamento che il riconsolidamento della memoria spaziale nell'ippocampo di topo (Artinian et al 2008).

L'analisi dell'espressione genica precedentemente condotta aveva mostrato che a 48 h dal condizionamento l'espressione dei geni codificanti per *tripartite motif protein 32* (TRIM32) e *proteasome maturation protein* (PMP) (proteine coinvolte nella maturazione del proteosoma), era aumentata in seguito a CFC.

Gli istogrammi di figura 18 mostrano l'espressione dei geni per TRIM32 (Fig. 18A) e PMP (Fig. 18B) a 72 h, 10 e 20 g dal

condizionamento. Come si può osservare, il gene di TRIM32 è espresso in misura significativamente maggiore nei cervelli di ratti CFC rispetto ai controlli (naive) a 48 h (CFC: $1,16 \pm 0,012$, naïve: $1,000 \pm 0,001$) e fino a 20 g dal condizionamento, (CFC: $1,2 \pm 0,001$ a 72h, $1,25 \pm 0,01$ a 10g e $1,32 \pm 0,03$ a 20g; naïve: $1,000 \pm 0,026$ a 72h, $1,000 \pm 0,04$ a 10g e $1,000 \pm 0,06$ a 20g; ANOVA $F = 19,38$, $p < 0,0001$ e Tukey post-hoc test $p < 0,001$ per tutti i tempi). Il gene di PMP a 72 h come a 48 h (CFC $1,236 \pm 0,09$ naïve $1,000 \pm 0,168$) è risultato espresso in modo significativamente maggiore rispetto ai controlli (naive), per poi riportarsi ai livelli costitutivi a 10 g e a 20g addirittura scendere sotto i livelli costitutivi (CFC: $1,935 \pm 0,149$ a

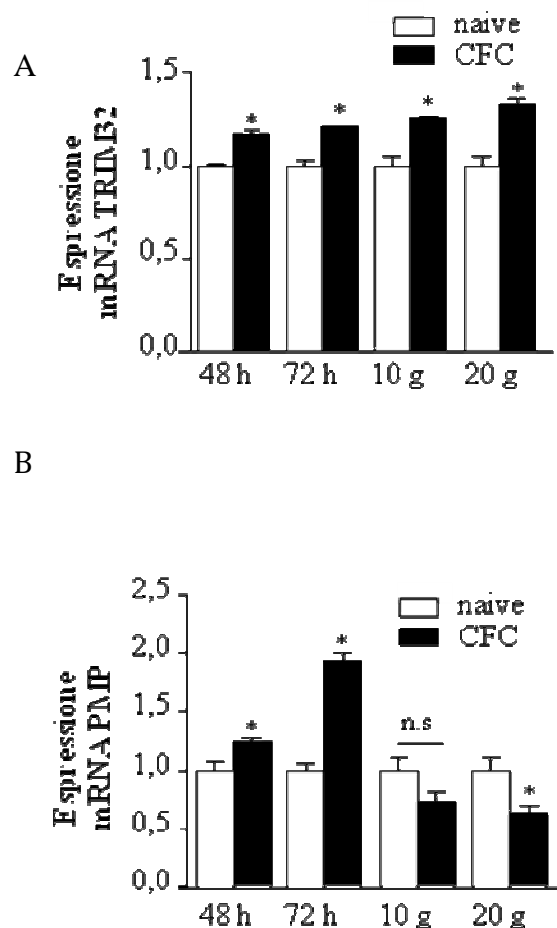


Fig. 18: Livelli di espressione di TRIM32 e PMP.

(A) Si noti come l'espressione del gene di TRIM32 sia significativamente maggiore rispetto ai valori costitutivi fino a 20 g dal condizionamento. (B) Il gene di PMP sia a 48 h sia a 72 h mostra un aumento dell'espressione statisticamente significativo rispetto ai livelli costitutivi, per poi portarsi a 10g ai livelli costitutivi e, a 20g, al di sotto di tali livelli. * indica $p < 0,05$, Tukey post-hoc test.

72h, $0,735 \pm 0,160$ a 10g e $0,630 \pm 0,130$ a 20g; naive: $1,000 \pm 0,147$ a 72h, $1,000 \pm 0,264$ a 10g e $1,000 \pm 0,244$ a 20g ; ANOVA $F = 24,82$, $p < 0,0001$ e Tukey post-hoc test $p < 0,001$, $p > 0,05$ e $p < 0,05$ rispettivamente).

4.2.3. Geni coinvolti nel processo apoptotico

Il processo apoptotico rappresenta un meccanismo importante nel mantenimento dell'omeostasi cellulare sia durante lo sviluppo che nella vita adulta. Questo meccanismo si realizza grazie all'attivazione a cascata di proteasi specifiche, le caspasi (Fuentes-Prior & Salvensen 2004).

L'analisi trascrittomica precedentemente condotta aveva dimostrato che a 48 h dal condizionamento l'espressione dei geni codificanti per caspasi 3 e p53, proteine coinvolte nella regolazione dell'omeostasi cellulare, era aumentata da CFC.

Gli istogrammi di figura 19 mostrano l'espressione dei geni per caspasi 3 (Fig. 19A) e p53 (Fig. 19B) a 72 h, 10 e 20 g dal condizionamento. Il gene di caspasi 3 che a 48 h era maggiormente espresso rispetto ai livelli costitutivi (CFC: $3,14 \pm 0,09$, naive: $1,000 \pm 0,08$) ritorna ai livelli costitutivi a 72h dal condizionamento, mentre a 10 e 20 g la sua espressione risulta statisticamente inferiore ai livelli costitutivi, (CFC: $0,88 \pm 0,05$ a 72 h, $0,1 \pm 0,01$ a 10 g e $0,27 \pm 0,05$ a 20 g; naive: $1,000 \pm 0,15$ a 72 h, $1,000 \pm 0,075$ a 10 g e $1,000 \pm 0,06$ a 20 g; ANOVA $F = 195,7$, $p < 0,0001$, Tukey post-hoc test $p > 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ rispettivamente). Il gene di p53 anch'esso maggiormente espresso rispetto ai livelli costitutivi a 48 h mostra una significativa riduzione dei livelli di espressione rispetto ai controlli (naive) da 72 h fino a 20 g

dal condizionamento (CFC: $0,255 \pm 0,048$ a 72h, $0,022 \pm 0,003$ a 10g e $0,048 \pm 0,005$ a 20g; naive: $1,000 \pm 0,105$ a 72h, $1,000 \pm 0,125$ a 10g e $1,000 \pm 0,155$ a 20g; ANOVA $F = 159,3$, $p < 0,0001$, Tukey post-hoc test $p < 0,001$ per tutti i tempi considerati).

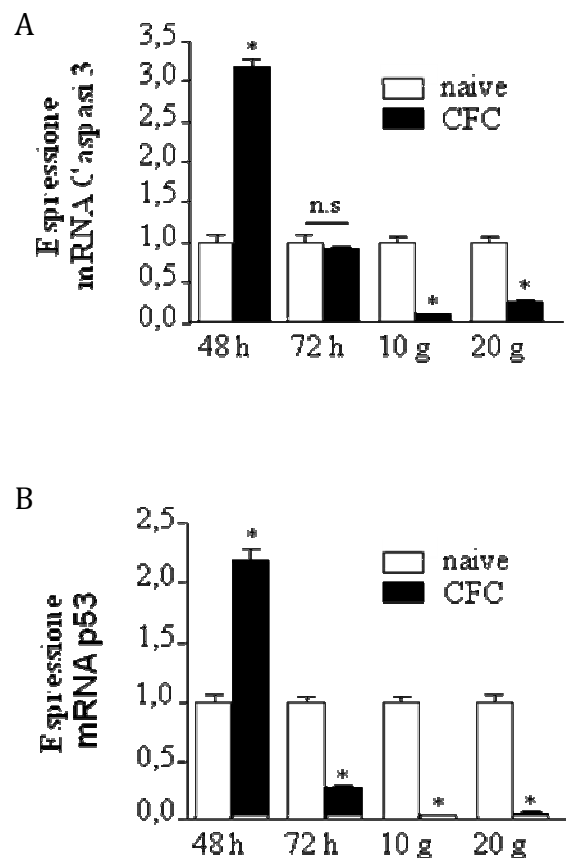


Fig 19: Livelli di espressione di caspasi 3 e p53.

(A) Si noti come il gene di caspasi 3 dopo un aumento di espressione a 48 h si porti ai livelli costitutivi a 72 h per poi a 10 e 20 g portarsi al di sotto dei livelli costitutivi. (B) Il gene di p53 dopo un aumento di espressione a 48 h riduce la sua espressione al di sotto dei livelli costitutivi fino a 20g dal condizionamento. * indica $p < 0,01$, Tukey post-hoc test

4.2.4. Geni coinvolti nell'attività mitocondriale

L'analisi trascrittomica precedentemente condotta aveva dimostrato che a 48 ore dal condizionamento i geni codificanti per *ATP synthase 6 mitochondrial* (ATPV6), *dynamin 1-like* (DPL1) e *translocase of outer mitochondrial membrane 20* (TOM20), proteine coinvolte nella sintesi di ATP, erano maggiormente espressi in seguito a CFC.

Gli istogrammi di figura 20 mostrano l'espressione dei geni per ATPV6 (Fig. 20A), DPL1 (Fig. 20B) e TOM20 (Fig. 20C). Come si può osservare, il gene di ATPV6 che a 48 h risultava maggiormente espresso rispetto ai livelli costitutivi in seguito a CFC (CFC: $1,118 \pm 0,033$, naive: $1,000 \pm 0,012$) si riporta ai livelli costitutivi a 72 h e fino a 10 g dal condizionamento, mentre a 20 g la sua espressione risulta statisticamente inferiore ai livelli costitutivi (CFC: $0,930 \pm 0,146$ a 72 h, $0,644 \pm 0,211$ a 10 g e $0,258 \pm 0,050$ a 20 g; naive: $1,000 \pm 0,197$ a 72 h, $1,000 \pm 0,248$ a 10 g e $1,000 \pm 0,354$ a 20 g; ANOVA $F = 10,65$, $p < 0,0001$, Tukey post-hoc test $p > 0,05$, $p > 0,05$ e $p < 0,001$ rispettivamente). Il gene di DPL1 anche a 72 h dal condizionamento è risultato espresso in modo significativamente maggiore rispetto ai controlli (naive), per poi a 10 g riportarsi ai livelli costitutivi e a 20 g scendere al di sotto di tali livelli (CFC: $2,046 \pm 0,289$ a 72 h, $1,504 \pm 0,294$ a 10 g e $0,357 \pm 0,164$ a 20 g; naive: $1,000 \pm 0,106$ a 72 h, $1,000 \pm 0,385$ a 10 g e $1,000 \pm 0,447$ a 20 g; ANOVA $F = 16,68$, $p < 0,0001$, Tukey post-hoc test $p < 0,001$, $p > 0,05$ e $p < 0,05$ rispettivamente). L'espressione del gene di TOM20 risulta ancora maggiore a 72 h dal condizionamento mentre a 10 g e 20 g si riporta al di sotto dei livelli costitutivi senza però raggiungere la significatività statistica (CFC: $2,082 \pm 0,324$ a 72 h, $0,684 \pm 0,107$ a 10 g e $0,795 \pm 0,251$ a 20 g; naive: $1,000 \pm 0,237$ a 72 h, $1,000 \pm 0,250$ a 10 g e $1,000 \pm 0,212$ a 20

g; ANOVA $F = 13,86$, $p < 0,0001$, Tukey post-hoc test $p < 0,001$ a 72
h e $p > 0,05$ a 10 e 20 g).

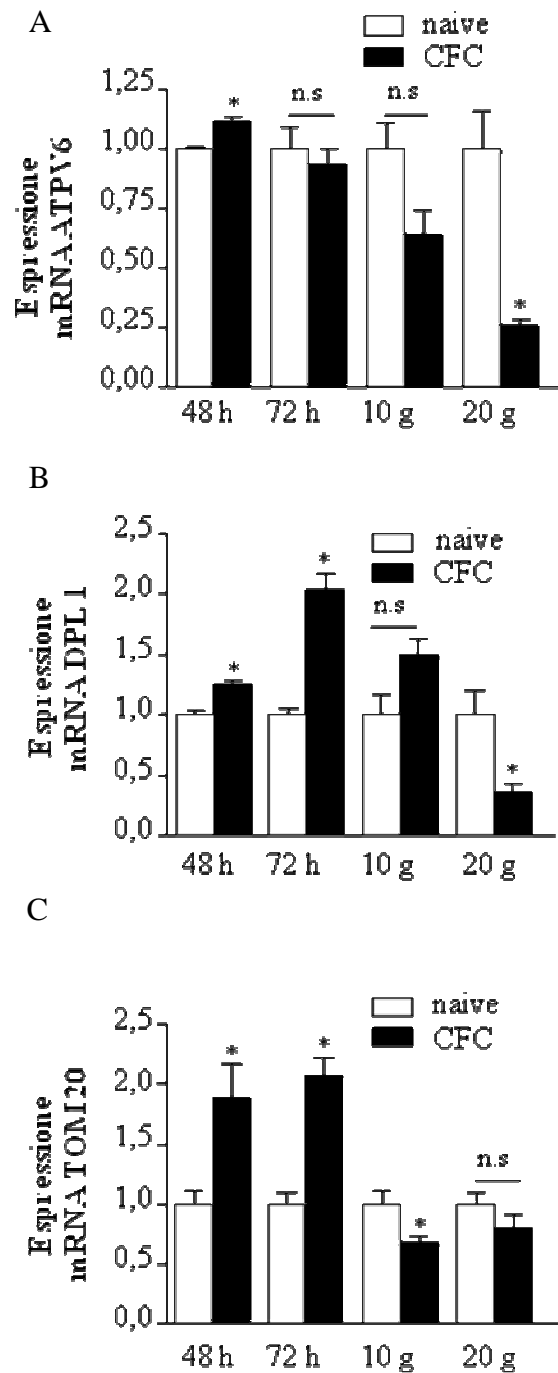


Fig. 20: Livelli di espressione di ATPV6, DPL1 e TOM20.

(A) Il gene di ATPV6 mostra un'elevata espressione a 48 h dal condizionamento mentre a 72 h e fino a 10g ritorna ai livelli costitutivi per portarsi al di sotto di tali livelli a 20 g. (B) Il gene di DPL1 fino a 72 h dal condizionamento è espresso in modo significativamente maggiore rispetto ai livelli costitutivi, mentre a 10g si porta ai livelli costitutivi, per poi a 20 g scendere al di sotto. (C) Il gene di TOM20 fino a 72 h dal condizionamento è espresso in modo significativamente maggiore rispetto ai livelli costitutivi, per poi portarsi al di sotto di tali livelli a 10 e 20 g. * indica $p < 0,05$, Tukey post-hoc test

4.2.5. Geni coinvolti nella trasduzione del segnale

L'analisi di espressione precedentemente condotta aveva dimostrato che a 48 ore dal condizionamento i geni codificanti per *phosphoprotein enriched in astrocytes 15* (PEA15), *PKA regulatory, type I, alpha* (PKA RI α), *14-3-3 zeta polypeptid* (14-3-3 ζ) e *TOR signaling pathway regulator-like* (TIP41), proteine coinvolte nella regolazione dell'attività sinaptica, erano modulati positivamente da CFC.

Gli istogrammi di figura 21 mostrano l'espressione dei geni per PEA15 (Fig. 21A), PKA RI α (Fig. 21B), 14-3-3 ζ (Fig. 21C), TIP41 (Fig. 21D) ai vari tempi presi in considerazione. Fig. 21A mostra come il gene di PEA15 espresso in modo significativamente maggiore a 48 h (CFC: $1,2 \pm 0,022$, naive: $1,000 \pm 0,012$) si porti e si mantenga a livelli statisticamente inferiori ai livelli costitutivi fino a 20 g dal condizionamento (CFC: $0,44 \pm 0,12$ a 72 h, $0,07 \pm 0,01$ a 10 g e $0,2 \pm 0,017$ a 20 g; naive: $1,000 \pm 0,017$ a 72 h, $1,000 \pm 0,16$ a 10 g e $1,000 \pm 0,15$ a 20 g; ANOVA $F = 17,489$, $p < 0,0001$, Tukey post-hoc test $p < 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,001$ rispettivamente). Il gene di PKA I mostra una diminuzione di espressione statisticamente significativa rispetto ai controlli (naive) fino a 20 g dal condizionamento (CFC: $0,391 \pm 0,320$ a 72 h, $0,150 \pm 0,02$ a 10 g e $0,06 \pm 0,01$ a 20 g; naive: $1,000 \pm 0,408$ a 72 h, $1,000 \pm 0,324$ a 10 g e $1,000 \pm 0,199$ a 20 g; ANOVA $F = 25,36$, $p < 0,0001$; Tukey post-hoc test $p < 0,001$ per tutti i tempi). L'andamento dell'espressione del gene di 14-3-3 ζ mostra un potenziamento e una marcata diminuzione statisticamente significativa fino a 20 g dal condizionamento, rispetto ai controlli (naive) (CFC: $0,192 \pm 0,150$ a 72 h, $0,142 \pm 0,02$ a 10 g e $0,144 \pm 0,04$ a 20 g; naive: $1,000 \pm 0,311$ a 72 h, $1,000 \pm 0,302$ a 10 g e $1,000 \pm 0,339$ a 20 g; ANOVA $F = 175,8$, $p < 0,0001$; Tukey post-hoc test $p < 0,001$ per tutti

i tempi). L'espressione del gene di TIP41, aumentato a 48 h, a 72 h si riporta ai livelli costitutivi per poi a 10 e 20 g portarsi a valori statisticamente inferiori rispetto a quelli costitutivi (CFC: 0.979 ± 0.169 a 72 h, 0.109 ± 0.015 a 10 g e 0.180 ± 0.045 a 20 g; naive: 1.000 ± 0.108 a 72 h, 1.000 ± 0.157 a 10 g e 1.000 ± 0.189 a 20 g; ANOVA $F = 46,71$, $p < 0,0001$; Tukey post-hoc test $p > 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,01$ rispettivamente).

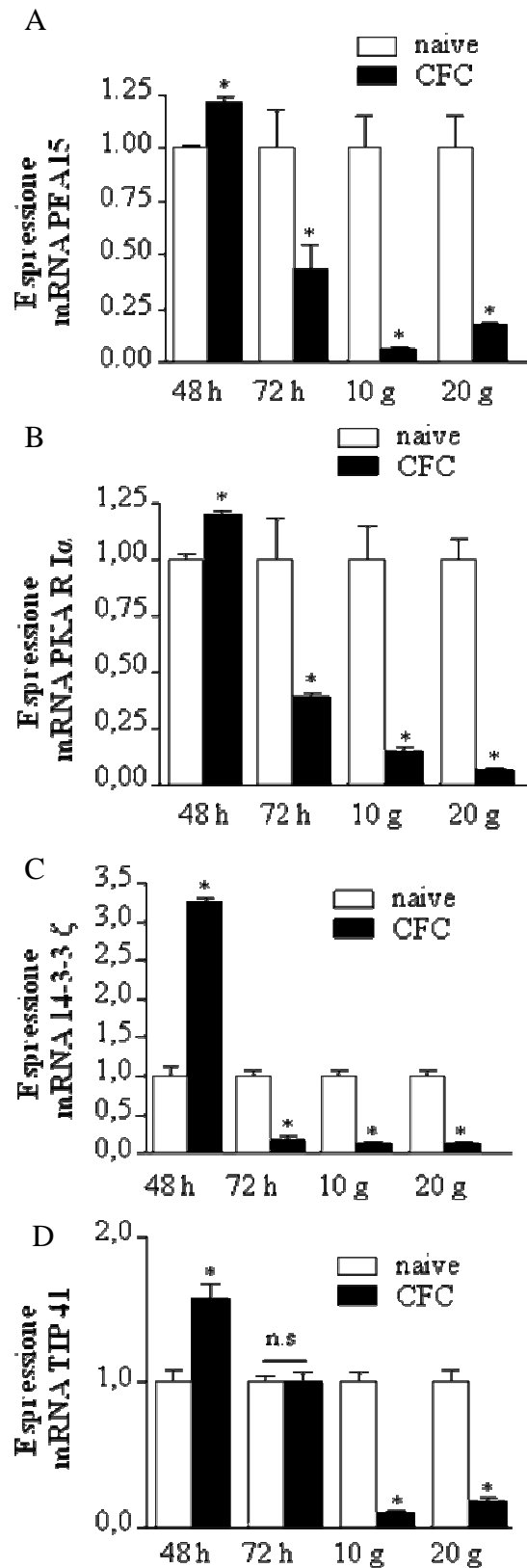


Fig. 21: Livelli di espressione di PEA15, PKA RIα, 14-3-3ζ, TIP41.

(A) Si noti come l'espressione del gene di PEA15 dopo le 48 h si porti e si mantenga a livelli statisticamente inferiori rispetto ai controlli (naive) fino a 20 g. (B) Il gene di PKA I si comporta come il gene di PEA15 così come (C) il gene di 14-3-3 ζ. (D) L'espressione del gene di TIP41 si porta ai livelli costitutivi a 72 h per poi portarsi a 10 g e mantenersi fino a 20 g al di sotto dei livelli costitutivi. * indica $p < 0,01$, Tukey post-hoc test

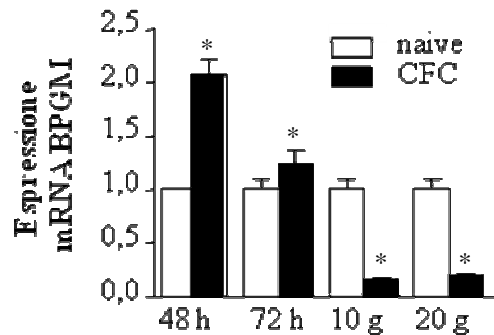
4.2.6. Geni coinvolti in funzioni cellulari varie

Dall'analisi trascrittomica precedentemente condotta era emerso che a 48 h dal condizionamento i geni codificanti per 2,3 *bisphosphoglycerate mutase* (BPGM), *RAN*, *member RAS oncogene family* (RAN) e nardilisina (NARD), proteine coinvolte nel metabolismo cellulare, erano espressi in modo significativamente maggiore rispetto ai livelli costitutivi da CFC.

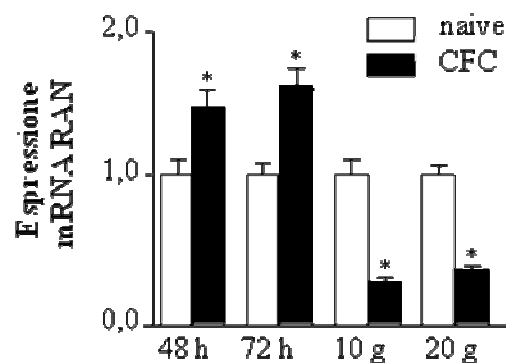
Gli istogrammi di figura 22 mostrano l'espressione dei geni per BPGM (Fig. 22A), RAN (Fig. 22B), NARD (Fig. 22C). Osservando l'andamento dell'espressione del gene per BPGM, si osserva che, nei tempi successivi alle 48 h (CFC: 2.068 ± 0.345 , naive: 1.000 ± 0.021) l'espressione si porta ai livelli costitutivi a 72 h dal condizionamento, al di sotto di tali livelli a 10 e 20 g (CFC: 1.246 ± 0.275 a 72 h, 0.158 ± 0.027 a 10 g e 0.195 ± 0.031 a 20 g; naive: 1.000 ± 0.213 a 72 h, 1.000 ± 0.227 a 10 g e 1.000 ± 0.219 a 20 g; ANOVA $F = 42,42$, $p < 0,0001$; Tukey post-hoc test $p > 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,001$ rispettivamente). L'espressione del gene di RAN mostra un aumento statisticamente significativo a 72h rispetto ai controlli (naive), per poi a 10 e 20g portarsi a livelli inferiori rispetto ai controlli (naive) (CFC: 1.587 ± 0.264 a 72h, 0.291 ± 0.040 a 10g e 0.365 ± 0.065 a 20g; naive: 1.000 ± 0.176 a 72h, 1.000 ± 0.235 a 10g e 1.000 ± 0.133 a 20g; ANOVA $F = 27,62$, $p < 0,0001$; Tukey post-hoc test $p < 0,001$ per tutti i tempi). Infine, il gene per nardi lisina (NARD) rimane espresso in modo significativamente maggiore rispetto ai livelli costitutivi anche a 72 h dal condizionamento, mentre a 10g si porta ai livelli costitutivi per poi a 20g scendere al di sotto di tali livelli (CFC: 1.350 ± 0.196 a 72h, 0.980 ± 0.098 a 10g e 0.365 ± 0.065 a 20g; naive: 1.000 ± 0.049 a 72h, 1.000 ± 0.212 a 10g e 1.000 ± 0.133 a 20g; ANOVA $F = 24,40$, $p <$

0,0001; Tukey post-hoc test $p < 0,01$, $p > 0,05$ e $p < 0,001$ rispettivamente).

A



B



C

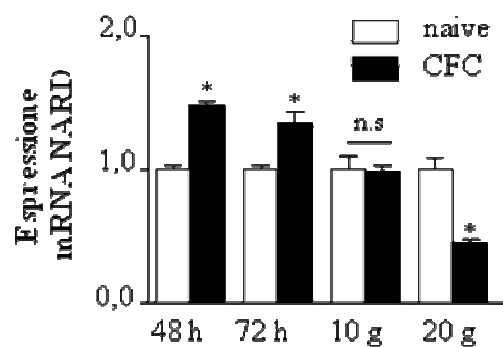


Fig. 22: Livelli di espressione di BPGM, RAN, nardilisina.

(A) Si noti come l'espressione del gene di BPGM, dopo le 48 h ritorni ai livelli costitutivi a 72 h per poi a 10g e 20g scendere al di sotto di tali livelli. (B) L'espressione del gene di RAN rimane aumentata significativamente a 72 h per poi a 10g e 20g essere statisticamente inferiore ai livelli costitutivi. (C) L'espressione del gene di nardi lisina (NARD) rimane aumentata significativamente a 72 h, a 10 g si porta ai livelli costitutivi e a 20 g scende al di sotto di tali livelli. * indica $p < 0,01$, Tukey post-hoc test

4.3 VALUTAZIONE TRADUZIONALE DI STATMINA I, PROFILINA 2 E AMFIFISINA I

Dopo aver valutato tramite PCR Real time la modulazione positiva del gene che codifica per le proteina statmina I e profilina 2, e la modulazione negativa del gene per la proteina amfifisina I è stato valutato mediante Western blot se, nelle regioni medio temporali del cervello di ratti condizionati al *contextual fear conditioning* a 48 h dal condizionamento, ad una maggiore/minore espressione del gene corrispondesse un aumento/diminuzione della concentrazione della proteina.

Come è possibile notare in figura 23A i *blots* corrispondenti alla proteina G3PDH, proteina usata come controllo interno, non mostrano una significativa differenza fra i campioni *naïve* e quelli CFC. I *blots* corrispondenti alla statmina I (Stat I) (*blots* inferiori) e alla profilina 2 (Prof 2), invece, mostrano un aumento dei livelli della sintesi proteica in seguito a condizionamento, mentre i *blots* corrispondenti alla amfifisina I mostrano una diminuzione dei livelli di sintesi della proteina.

In Fig. 23B sono riportati gli istogrammi che mostrano i livelli di espressione calcolati dividendo la densità ottica dei *blots* della Stat1 per la densità ottica dei *blots* di G3PDH. Come si può osservare il valore del rapporto calcolato dopo CFC (0.507 ± 0.04 ; $n = 4$) è significativamente maggiore (*Unpaired t test*, $p = 0.0061$) rispetto a quello ottenuto nei *naïve* (0.332 ± 0.161 ; $n = 4$).

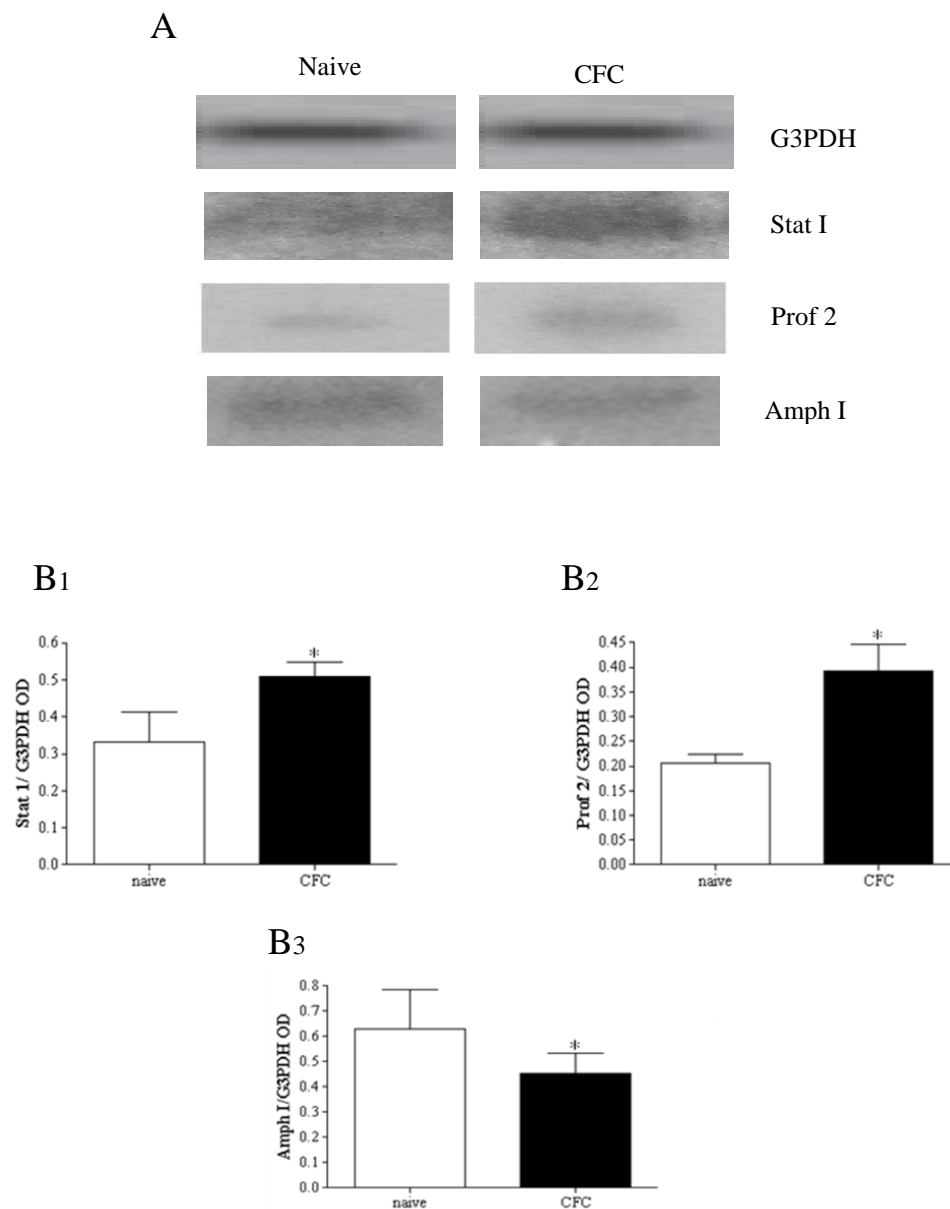


Fig. 23: Analisi dei livelli di sintesi della statmina I, profilina 2 e amfifisina I effettuata tramite Western Blot.

(A) I *blots* superiori corrispondono alla proteina G3PDH, i *blots* inferiori corrispondono rispettivamente alla statmina I (Stat1), profilina 2 (Prof 2), amfifisina 1 (Amph 1). Come atteso G3PDH non mostra variazioni di intensità nei campioni considerati, mentre i *blots* per Stat I, Prof 2 mostrano un aumento dei livelli di sintesi e per Amph 1 una diminuzione dei livelli di sintesi in seguito a condizionamento. (B) Gli istogrammi sono stati costruiti considerando i livelli di espressione delle proteine calcolati dividendo la densità ottica dei *blots* delle varie proteine per la densità ottica dei *blots* di G3PDH. (*) indica $p < 0,05$, t test per dati non appaiati.

4.4. Localizzazione mediante immunofluorescenza della proteina Statmina I

L'analisi condotta con RT-PCR Real time e Western Blot, ha evidenziato che nei ratti CFC l'aumento di mRNA codificante la statmina I a 48 h dal condizionamento è seguito da un aumento dei livelli della proteina espressa.

Come dimostrato in precedenti lavori (Yamada K. et al 2010, Diao W. F et al 2007, Morii H. et al 2006), statmina I è espressa basalmente nell'ippocampo.

Come mostra la figura 24, fettine di ippocampo ottenute da cervelli di ratti sottoposti a CFC e sacrificati 48 h dopo il condizionamento mostrano nello strato granulare del giro dentato una più densa marcatura con anticorpo anti-statmina I (Calbiochem-Merck, France) (Fig. 24A) rispetto a fettine ottenute da cervelli di ratti naive (Fig. 24B).

In Fig. 24C sono riportati gli istogrammi che mostrano i livelli di espressione calcolati dividendo l'intensità media dei pixel (scala di grigio) dei singoli campi nello strato granulare del giro dentato della Stat1 per l'intensità media dei pixel (scala di grigio) dei singoli campi nello strato granulare del giro dentato di G3PDH. Come si può osservare il valore del rapporto calcolato dopo CFC (44.44 ± 3.4 ; $n = 5$) è significativamente maggiore (*Unpaired t test*, $p = 0.0092$) rispetto a quello ottenuto nei ratti *naïve* (27.3 ± 10.75 ; $n = 5$).

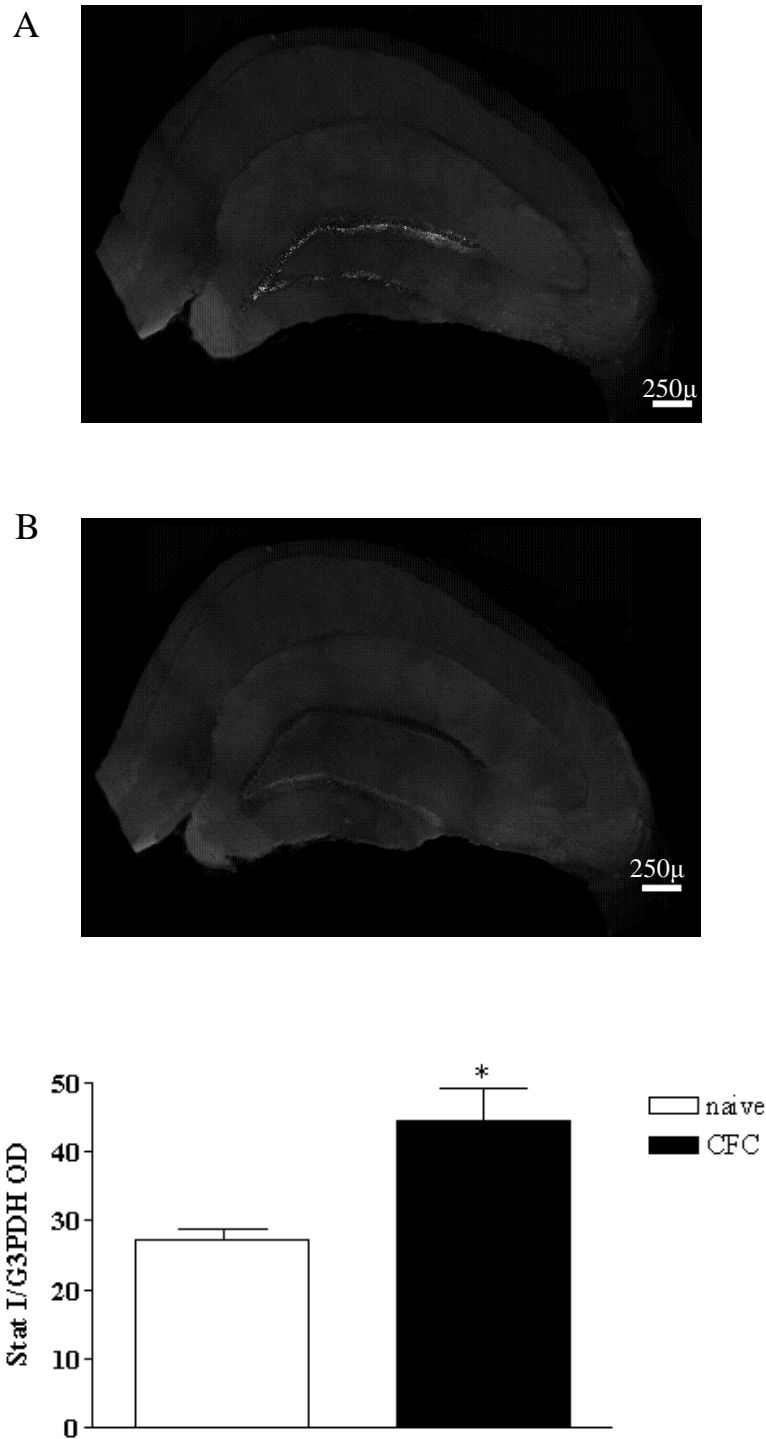


Fig. 24: Analisi dei livelli di sintesi della Statmina 1 effettuata tramite IF.

(A) L'immagine superiore corrisponde alla proteina G3PDH, quella inferiore invece corrisponde alla statmina I (Stat I). Come atteso G3PDH mostra una marcatura inferiore nel campione considerato, mentre stat I mostra un marcatura più intensa in modo particolare a livello della regione del giro dentato a 48 h dal condizionamento. (B) Gli istogrammi sono stati costruiti considerando i livelli della media dei pixel presenti in ciascun campione dividendo l'intensità media dei pixel nello strato granulare del giro dentato di Stat I per l'intensità media dei pixel nello strato granulare del giro dentato di G3PDH. (*) indica $p < 0,05$, t test per dati non appaiati.

5. DISCUSSIONE

Il presente lavoro descrive l'analisi della variazione di espressione di alcuni geni nella regione medio-temporale di cervelli di ratti sottoposti a *contextual fear conditioning* (CFC), a diversi tempi dal condizionamento 72 h, 10 e 20 g. CFC è una variante del condizionamento classico, nella quale viene valutata la risposta ad uno stimolo neutro, nel nostro caso rappresentato dall'ambiente, in seguito alla presentazione di uno stimolo incondizionato rappresentato da una sequenza di scosse elettriche. Questo tipo di condizionamento consente di valutare meccanismi sia legati all'apprendimento sia coinvolti nelle risposte emozionali quali la paura.

Osservazioni precedenti condotte su ratti sottoposti a CFC (Sacchetti et al., 2001) avevano evidenziato modificazioni comportamentali (risposta di *freezing*), e cambiamenti nell'eccitabilità ippocampale che persistevano a lungo (Sacchetti et al., 2002), suggerendo che le modificazioni osservate derivassero da una modulazione sia dell'espressione genica sia della sintesi proteica. In seguito, dopo ibridazione sottrattiva e soppressiva e successivo *screening* primario è stato possibile isolare un *pool* di geni candidati ad essere differenzialmente espressi e, mediante PCR Real-time, confermare una modulazione positiva dell'espressione di 19 di questi geni e la modulazione negativa dell'espressione del gene per la amfifisina I in seguito a CFC a 48 ore dal condizionamento (vedi Tab. 1). Tali geni codificano per proteine implicate a) nella modulazione sinaptica, b) nel *turn-over* proteico, c) nei processi apoptotici, d) nell'attività mitocondriale, e) nella trasduzione del segnale e f) in processi cellulari vari.

Nel presente lavoro è stato analizzato se l'espressione dei geni individuati a 48 h permanesse modulata per tempi più lunghi, magari

per tutta la durata della risposta alla paura, allo scopo di valutare se i geni la cui espressione è modulata positivamente o negativamente precocemente durante il condizionamento mantengano gli stessi livelli di espressione per tutto il tempo in cui si osservano le modificazioni comportamentali, oppure se alcuni geni mostrino un particolare andamento di espressione rispetto ad altri e quali geni per primi inizino a diminuire la loro espressione.

A tale scopo sono stati presi in considerazione ratti condizionati e sacrificati a 72 h, a 10 g e a 20 g dal condizionamento e ratti di controllo; dalle regioni medio-temporali dei loro cervelli è stato ottenuto RNA totale retrotrascritto in cDNA e analizzato mediante PCR Real-time.

5.1 Espressione dei geni codificanti per proteine coinvolte nella modulazione sinaptica

È noto che i meccanismi alla base della memoria implicano fenomeni di plasticità sinaptica. Il *time-course* dell'espressione dei geni che codificano per proteine implicate nella modulazione sinaptica da noi osservato, ha evidenziato che i geni che codificano per statmina I e profilina 2 mostrano un aumento di espressione statisticamente significativo rispetto ai controlli fino a 10 g, per poi scendere al di sotto dei livelli costitutivi a 20 g; il gene di amfifisina I che a 48 h era espresso in modo significativamente inferiore rispetto ai livelli costitutivi, a 72 h e a 10 g è risultato espresso in modo significativamente maggiore rispetto ai controlli per ritornare a 20 g ad assumere valori statisticamente inferiori a quelli costitutivi. Per il gene di ARP 3 si è osservato che, ai tempi successivi alle 48 h l'espressione genica è significativamente maggiore rispetto ai controlli a 72 h, per

poi tornare a 10 g ai livelli costitutivi ed infine a 20 g assumere valori statisticamente inferiori a quelli costitutivi. Il gene di NAPA è risultato espresso a livelli costitutivi a 72 ore, mentre a 10 e 20 giorni dal condizionamento la sua espressione si è portata a valori significativamente inferiori rispetto ai controlli. Infine, il gene che codifica per la complessina I ha mostrato ai tempi successivi alle 48 ore un'espressione minore e statisticamente significativa nei ratti CFC rispetto ai controlli per tutti i tempi considerati.

Statmina I è nota come inibitore della formazione dei microtubuli: si lega infatti alla tubulina impedendone la polimerizzazione; è inoltre substrato della chinasi Cdk5 che la fosforila soprattutto a livello del residuo Ser38 e della MAP chinasi δ che ha come bersaglio il residuo Ser25. Shumyatsky et al. (2005) hanno rilevato un'alta espressione del gene per statmina I nei neuroni del nucleo laterale dell'amigdala e in quelli delle strutture talamiche e corticali che inviano a quest'area informazioni relative agli stimoli incondizionati della paura innata e agli stimoli condizionati della paura appresa. Gli stessi autori descrivono che topi knock-out per il gene di statmina I mostrano deficit di memoria nei test di condizionamento alla paura amigdala-dipendenti mentre non mostrano modificazioni di *performance* nell'apprendimento spaziale ippocampo-dipendente. Mentre nel topo, la statmina I sembra fondamentale nell'induzione di LTP a livello dell'amigdala, (ciò rende conto del suo coinvolgimento nell'apprendimento alla paura), nel nostro studio condotto nel ratto, abbiamo rilevato non solo un aumento di espressione del gene in tutte le aree medio-temporali ma anche un'alta espressione della proteina nel giro dentato dell'ippocampo (vedi Fig. 24). I risultati del presente studio sembrano quindi indicare che il ruolo svolto dalla statmina I nel riarrangiamento dei microtubuli sia determinante sia nell'apprendimento contestuale che nell'apprendimento alla paura.

Amfifisina I è coinvolta nel meccanismo dell'endocitosi clatrina-dipendente, è essenziale per la fagocitosi ed ha un ruolo critico nella polimerizzazione actinica (Yamada et al., 2007). Questa proteina, di cui sono ricchi i terminali assonali, possiede inoltre un dominio SH3 mediante il quale si lega alla dinamina I e promuove il *reuptake* del neurotrasmettitore eccitatorio glutammato. I nostri dati indicano una iniziale riduzione di espressione di amfifisina I che probabilmente serve a favorire la trasmissione sinaptica poiché riduce il *reuptake* del neurotrasmettitore, e un successivo aumento di espressione a 72 h e fino a 10 g che tenderebbe a sostenere fenomeni di *neuronal sprouting*, cioè di emissione di nuovi prolungamenti neuronali (assonali e/o dendritici) (vedi Fig. 7) al fine di stabilire nuove connessioni che consentono di stabilizzare le tracce mnemoniche acquisite. Quando ciò è avvenuto, amfifisina I deve probabilmente essere silenziata e per questo trascorsi 20 giorni dal condizionamento la sua espressione diminuisce drasticamente.

Il *complesso silenziatore indotto da RNA* noto come **RISC**, è probabilmente responsabile attraverso la sua componente RNAsica della degradazione di RNA precedentemente formato. La sua corretta attivazione sembra fondamentale nell'instaurarsi di processi di apprendimento legati al contesto e alla paura. Un recente studio condotto sui topi (Batassa et al., 2010) mette in evidenza come un'alterata attività di RISC a livello ippocampale porti a severi deficit in CFC valutato a lungo termine.

Le profiline sono una famiglia di proteine che, legando la G-actina, svolgono un ruolo chiave nella regolazione delle dinamiche citoscheletriche (Schluter, et al., 1997). Nel topo e nell'uomo sono stati identificati quattro geni che codificano per quattro diverse isoforme (1-4) della proteina. In varie regioni del cervello, ippocampo compreso, è più rappresentata la profilina 2, alla quale è riconosciuto un ruolo

importante nel controllo dell'attività sinaptica poiché promuove la polimerizzazione dell'actina nelle sinapsi (Pilo Boyl et al., 2007). Questa proteina si associa con sinapsina, dinamina 1 (Witke et al., 1998) e con altre proteine (Nap1, Cyfip/Sra1 e WAVE1) che costituiscono il complesso proteico definito *WAVE-complex* (Witke et al., 1998). La quantità di profilina 2 presente a livello delle sinapsi potrebbe giocare quindi un ruolo importante nel controllo della polimerizzazione dell'actina, e quindi nel rilascio delle vescicole sinaptiche (Pilo Boyl et al, 2007). Un'altra caratteristica della profilina 2 è la capacità di interagire con ligandi come ROCK2, sinapsina, POP-130/CyFIP1 e dinamina, coinvolti nella trasduzione del segnale, nel traffico di membrana e nel riciclo delle vescicole sinaptiche (Witke et al., 1998) operando come regolatore del traffico di membrana. Queste evidenze non escludono un ruolo postsinaptico della profilina 2, ma evidenziano che questa proteina svolge le sue funzioni principalmente a livello presinaptico, controllando il rilascio di vescicole di neurotrasmettitore e l'eccitabilità neuronale (Dillon & Goda, 2005).

I risultati da noi ottenuti documentano un aumento dell'espressione del gene per profilina 2 fino a 10 giorni dal condizionamento. Ciò conferma che alla base di CFC vi è un riarrangiamento delle strutture citoscheletriche che una volta avvenuto non necessita più di elevati livelli di profilina 2 che, infatti, trascorsi 20 giorni dal condizionamento, si porta al di sotto dei livelli costitutivi.

Dai nostri dati è emerso anche che il gene per ARP3 è espresso in modo significativamente maggiore rispetto ai livelli costitutivi sino a 72 h dal condizionamento, per poi riportarsi a 10 giorni ai livelli costitutivi. Questa modulazione positiva del gene nei tempi subito seguenti il condizionamento suggerisce che durante CFC si possa avere una riorganizzazione delle spine dendritiche nei terminali postsinaptici e quindi una riorganizzazione delle connessioni fra i neuroni nelle

regioni medio-temporali del cervello di ratto. Infatti ARP 3 è una proteina che regola la crescita dei filamenti di actina: si associa alla proteina 2 correlata all'actina (Act2) a formare il complesso ARP2/3 il quale è essenziale per la formazione dei filamenti di actina in tutti i tessuti compreso il tessuto nervoso (Pollard & Borisy, 2003). Studi recenti condotti in colture di cellule ippocampali hanno dimostrato che la formazione delle spine dendritiche e delle sinapsi è regolata dalla *neural Wiskott-Alrich syndrome protein* (N-WASP) proprio attraverso il complesso ARP2/3 (Wegner et al., 2008) che consente la formazione dei filamenti ramificati di actina legandosi al lato del filamento preesistente (madre) fino a originare la formazione di un nuovo filamento di actina (figlio). Nel nostro modello, l'espressione di ARP3 aumenta progressivamente nelle prime 72 h per poi progressivamente ridursi fino a risultare al di sotto dei livelli di espressione costitutiva trascorsi 20 giorni dal condizionamento: ciò suggerisce che l'aumento iniziale di ARP3, così come di profilina 2, sia indispensabile per il riarrangiamento sinaptico che si deve attuare per l'instaurarsi di CFC; una volta che ciò è avvenuto ARP3 viene silenziata.

NAPA o α -SNAP è la più abbondante ed ubiquitaria delle tre isoforme di SNAP presenti nei mammiferi. α -SNAP è conosciuta inibire l'esocitosi Ca^{2+} -dipendente o perché favorisce il disassemblaggio del complesso SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) ad opera del complesso NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) ((John & Scheller 2006; Sudhof & Rothman 2009), o perché, come recentemente evidenziato (Barszczewski et al., 2008), legandosi alla sintassina previene l'assemblaggio di SNARE stesso. Il sistema NSF- α SNAP deve essere bilanciato per consentire normali livelli di esocitosi. La regolazione di questo bilancio dovrebbe avvenire sulle concentrazioni o sull'attività di entrambe o di una delle due proteine. Ad oggi non ci sono evidenze in

questo senso per α SNAP, mentre è noto che l'attività di NSF può essere modulata da meccanismi di fosforilazione e nitrosilazione (Morrell et al., 2005).

Dai dati ottenuti dal nostro lavoro è emerso che il gene di NAPA è espresso al di sopra dei livelli costitutivi a 48 h dal condizionamento per poi tornare a 72 h ai livelli costitutivi e infine, scendere al di sotto dei livelli costitutivi dopo 10 g dal condizionamento. Questa modulazione tempo-dipendente dell'espressione genica di NAPA probabilmente è legata alla necessità di assicurare durante e subito dopo CFC adeguati livelli di neurotrasmissione. D'altra parte dal nostro studio è emersa anche una modulazione tempo-dipendente del gene per complessina I (COMPI), che al contrario di NAPA attiva il complesso SNARE (Giraud et al 2006). I risultati da noi ottenuti documentano un aumento dell'espressione del gene per COMPI a 48 h dal condizionamento per poi scendere al di sotto dei livelli costitutivi a tutti i tempi considerati.

Nel cervello di ratto, esistono due principali isoforme di complessina: la complessina I (COMPI) e la complessina II (COMPII) (Yamada M. et al 1999); espresse a livello di varie aree del cervello, COMPI è maggiormente rappresentata nella regione CA₃ dell'ippocampo, negli strati 4-5 della corteccia, nel cervelletto e nel talamo, mentre COMPII viene espressa a livello della regione CA₁ dell'ippocampo, nell'amigdala, nello striato e negli strati 2-3 e 5-6 della corteccia.

Vista la loro localizzazione e il loro ruolo, in accordo con i nostri risultati, alcuni autori hanno ipotizzato una possibile implicazione delle complessine nell'apprendimento motorio, nelle funzioni cognitive e nelle emozioni (Freeman & Morton 2004). In gravi disordini neurodegenerativi si ha un'anormale espressione di COMPI (Di Prospero et al 2004; Basso et al 2004; Hazell & Wang 2005); topi knock-out per COMPI sottoposti a vari test di condizionamento hanno

mostrato atassia, e quando veniva loro insegnato a nuotare questi mostravano deficit di apprendimento (Drew et al., 2007).

5.2 Espressione dei geni codificanti per proteine coinvolte nel *turn over* proteico

Il gene che codifica TRIM32 è risultato espresso in misura significativamente maggiore nei cervelli di ratti CFC rispetto ai controlli a tutti i tempi considerati.

Il *turn over* proteico è il processo che garantisce la degradazione delle proteine in tutti i tessuti cellulari. Tale meccanismo si realizza soprattutto tramite il sistema ubiquitina proteasoma (UPS). L'ubiquitina marca le proteine da degradare, che saranno poi riconosciute dal proteasoma. L'ubiquitinizzazione di una proteina *target* prevede molteplici reazioni enzimatiche catalizzate da una cascata di enzimi, tra cui l'enzima attivante l'ubiquitina (E1), l'enzima coniugante l'ubiquitina (E2) e l'enzima ligasi dell'ubiquitina (E3). TRIM32 appartiene alla famiglia delle proteine conosciute anche come proteine RBCC che contengono uno o due *B-boxes*, una regione *coiled-coil* e domini RING, molti dei quali hanno attività di ubiquitina ligasi (E3) (Kano et al., 2008). In CFC una maggiore espressione di TRIM32 potrebbe significare una maggiore attività di tipo ubiquitina ligasi e quindi una maggiore degradazione proteica. Inoltre i dati ottenuti mostrano come il gene della *proteina di maturazione del proteosoma* (PMP) a 72 h come a 48 h sia risultato espresso in modo significativamente maggiore rispetto ai controlli per poi riportarsi ai livelli costitutivi a 10 g e a 20g addirittura scendere sotto i livelli costitutivi. La proteina PMP, localizzata sia nel citosol che nel nucleo (Hoefler et al., 2006), è necessaria per la maturazione del complesso 20S del proteasoma. PMP agisce da *chaperone* ed assiste

l'assemblaggio di due meta-proteosomi (precursore 13-16S) e da ultimo viene degradata essa stessa dal proteasoma maturo. Questi risultati indicano che in CFC si ha aumento della degradazione proteica mediante attivazione del sistema proteosomico al quale concorrono vari complessi proteosomici regolati rispettivamente da TRIM32 e PMP che probabilmente agendo su complessi proteosomici diversi vengono codificati in tempi diversi e con cinetiche specifiche. In letteratura è messo in evidenza che nel topo, la degradazione proteica regolata da UPS è richiesta sia durante il consolidamento che il riconsolidamento della memoria spaziale nell'ippocampo (Artinian *et al.*, 2008) e ciò è in accordo con quanto ottenuto in questo studio.

5.3 Espressione dei geni codificanti per proteine coinvolte nei processi apoptotici

I geni che codificano per caspasi 3 e p53 a 48 h dal condizionamento avevano mostrato un aumento dell'espressione rispetto ai livelli costitutivi; ai tempi da noi considerati, il primo si è portato ai livelli costitutivi a 72 h mentre a 10 e 20 g la sua espressione è scesa al di sotto, il secondo ha mostrato una significativa riduzione dei livelli di espressione rispetto ai controlli a tutti i tempi.

Le caspasi sono delle cisteine-proteasi conosciute principalmente per il loro coinvolgimento nella regolazione della morte cellulare programmata o apoptosi. L'attività di caspasi 3 è indotta da una cascata di molecole pre-apoptotiche e mantenuta dalle IAP (inibitori delle proteine apoptotiche) (Srinivasula & Ashwell, 2008).

Interessante è il fatto che caspasi attive sono state trovate anche in cellule non-apoptotiche. Ad esempio, nei neuroni, le caspasi sono presenti nei dendriti, negli assoni e nelle porzioni pre-e postsinaptiche. Vari studi hanno dimostrato che le caspasi possono essere attivate nei

dendriti, nei sinaptosomi e nei coni di crescita (Campbell & Holt, 2003; Gilman & Mattson, 2002; Kuo et al., 2006; Williams et al., 2006; Yuan et al., 2006); quando attivate, possono sopprimere correnti sinaptiche e, nello specifico, da uno studio condotto in vitro, è emerso che le caspasi 3 possono legarsi alla subunità GluR1 dei recettori AMPA (Chan et al., 1999; Glazner et al., 2000; Lu et al., 2002). È stato riportato che le caspasi giocano un importante ruolo in *Drosophila* nel rimodellamento dei dendriti durante lo sviluppo (Kuo et al., 2006; Williams et al., 2006), in *Xenopus* nel rimodellamento strutturale delle sinapsi dei neuroni dell'ippocampo e nei coni di crescita della retina (Campbell & Holt, 2003; Gilman & Mattson, 2002), e negli uccelli nell'apprendimento del canto (Huesmann & Clayton, 2006). Questi dati ascrivono alle caspasi effetti “non apoptotici”. Recentemente Li et al., (2010) hanno dimostrato il coinvolgimento della via mitocondriale di attivazione di alcune caspasi compresa caspasi 3 nella depressione sinaptica in *slices* di ippocampo di ratto. È stato visto che LTD e l'internalizzazione dei recettori AMPA richiedono l'attività proprio di caspasi 3/7 e caspasi 9 e possono essere bloccate da una sovraespressione di proteine antiapoptotiche. È stato anche osservato che caspasi 3 può essere attivata dalla stimolazione di recettori NMDA, senza causare morte cellulare. Inoltre, in topi KO per caspasi 3 si ha perdita di induzione NMDA-dipendente di LTD in fettine di ippocampo (Li et al., 2010). Probabilmente l'aumento dell'espressione del gene osservato a 48 h da CFC potrebbe essere legato a fenomeni “non apoptotici” (quali una modulazione sinaptica), mentre il suo permanere altamente espresso potrebbe innescare o fenomeni apoptotici o meccanismi di rimozione dei recettori AMPA con conseguente alterazione della trasmissione glutammatergica e degenerazione delle spine dendritiche con compromissione dell'apprendimento ippocampo-dipendente come recentemente

osservato da D'Amelio e collaboratori (2011) in topi Tg2576 APPSw (un modello animale di malattia di Alzheimer); questi possibili eventi possono spiegare la progressiva riduzione di espressione da noi osservata nei tempi successivi presi in considerazione.

p53 è una fosfoproteina nucleare che si lega al DNA attivando fattori di trascrizione implicati nei meccanismi di *DNA repair* (Ko & Prives, 1996). Più recentemente è stato osservato come una forma di aploinsufficienza di p53, p73, fa sì che i topi aploidi siano suscettibili alla neurodegenerazione, abbiano una ridotta funzione sia motoria che cognitiva e mostrino atrofia del sistema nervoso (Wetzel et al., 2008). Ciò indica che l'integrità di p53 è indispensabile per prevenire alterazioni di tipo neurodegenerativo e cognitivo. A questo proposito nel 2010 Rivas-Arancibia et al. hanno osservato che nell'ippocampo di ratti sottoposti a esposizione prolungata di ozono che induce morte cellulare, nelle cellule sopravvissute c'è un'elevata quantità di p53 traslocata nel nucleo. Nel nostro modello di condizionamento alla paura e al contesto si è osservato un'iniziale maggiore espressione del gene per p53 seguita immediatamente dopo da una ridotta espressione come se la proteina p53 fosse necessaria per innescare processi di trascrizione coinvolti solo nella fasi iniziali dell'apprendimento.

5.4 Espressione dei geni codificanti per proteine coinvolte nell'attività mitocondriale

L'analisi trascrittomica precedentemente condotta aveva evidenziato un aumento di espressione a 48 h dal condizionamento dei geni codificanti per ATP V6, dinamina I e TOM 20 (vedi sotto), proteine necessarie per l'attività mitocondriale.

La subunità ATP V6 è parte integrante del complesso dell'ATP sintasi, enzima associato alla membrana mitocondriale interna che accoppia il flusso di protoni transmembrana alla sintesi di ATP. Insieme alla subunità 8 è codificata dal genoma mitocondriale

L'analisi condotta in questo lavoro ha dimostrato che a 72 h e fino a 10 g dal condizionamento l'espressione del gene di ATP V6 si riporta ai livelli costitutivi, mentre a 20 g è statisticamente inferiore ai livelli costitutivi. Una modulazione dell'espressione del gene di questa subunità è stata osservata in vari modelli: nella corteccia visiva del gatto, durante il primo mese di vita postnatale, periodo critico per la plasticità neuronale nella corteccia visiva (Yang et al., 2001); nell'ippocampo di ratto durante il mantenimento di LTP (Williams et al., 1998). Uno studio più recente condotto sul condizionamento associativo visivo-olfattivo nell'insetto *Periplaneta americana* ha evidenziato un aumento dell'espressione del gene mitocondriale di ATPasi V6 durante la fase di consolidamento dell'associazione tra gli stimoli (Pinter et al., 2005), in centri nervosi associati alla memoria e all'apprendimento che mostrano un'organizzazione funzionale e meccanismi molecolari simili a quelli dell'ippocampo dei mammiferi (Cayre, et al., 2002; Heisemberg, 2003);

Una possibile spiegazione della correlazione tra l'incremento a 48 h e il successivo decremento di espressione del gene per ATP V6 da noi osservato e la plasticità sinaptica, può essere data dal fatto che l'ATP

prodotto inizialmente in maggior quantità dai mitocondri sia utilizzato per il trasporto assoplasmatico rapido e per la sintesi di macromolecole e neurotrasmettitori necessari nelle prime fasi dell'apprendimento, mentre per i cambiamenti morfologici, come la rimozione delle connessioni preesistenti e la formazione di nuovi contatti sinaptici, propri delle fasi di consolidamento, la richiesta di energia possa essere soddisfatta da un aumento dell'attività mitocondriale dovuto ad un accumulo di mitocondri a livello dei siti plastici. A questo proposito i nostri dati mostrano anche un aumento a 72 h dell'espressione della proteina "dinamina 1 simile". Questa proteina è fondamentale per un corretto processo di fissione dei mitocondri e nel controllo della morfologia e della ridistribuzione dei mitocondri nelle varie porzioni della cellula (Wang et al., 2008). Una adeguata fissione mitocondriale assicura il fabbisogno energetico a livello di particolari localizzazioni subcellulari quali i terminali sinaptici dei neuroni.

Dal nostro studio è emerso anche che durante CFC si ha modulazione dell'espressione del gene per TOM 20 un componente periferico del complesso TOM (translocasi della membrana esterna mitocondriale), un complesso multiproteico che media l'entrata della maggior parte delle proteine mitocondriali all'interno del mitocondrio stesso dopo essere state prodotte nei ribosomi (Perry et al., 2008). Un aumento di espressione di questa proteina è probabilmente legato ad un aumento dell'attività mitocondriale in accordo con la modulazione dei geni per ATP V6 e per la proteina "dinamina 1 simile". Il fatto che a CFC sia associata una modulazione dei geni per queste proteine suggerisce che l'attività mitocondriale sia fondamentale nei processi di apprendimento anche se al momento dati in letteratura mettono in evidenza soltanto il fatto che una non corretta espressione di queste proteine possa portare a malattie di tipo neurodegenerativo alle quali in genere sono associati deficit cognitivi (Wang et al., 2008).

5.5 Espressione dei geni codificanti per proteine coinvolte nella trasduzione del segnale

L'analisi trascrittomica condotta sulle regioni medio-temporali dei cervelli di ratti sottoposti a CFC rispetto a ratti di controllo ha evidenziato un aumento nelle prime 48 h seguito, a partire da 72 h dal condizionamento, da una riduzione al di sotto dei livelli costitutivi dell'espressione di geni codificanti per proteine responsabili dell'attivazione della trascrizione e in particolare di quella CREB-dipendente. Tali proteine sono: *protein enriched in astrocytes 15* (PEA 15), la subunità regolatoria I α della PKA e l'isoforma ζ della proteina 14,3,3.

PEA 15, espressa sia nei neuroni che negli astrociti, regola la MAP chinasi ERK mantenendola attiva nel citoplasma e può anche attivare direttamente il substrato di ERK RSK2: in questo modo PEA 15 può attivare la trascrizione CREB-dipendente risultando implicata nel passaggio dell'apprendimento da breve a lungo termine. Il suo coinvolgimento in forme di apprendimento spaziale è stato documentato recentemente (Ramos et al., 2009) in uno studio condotto su topi KO per la proteina, i quali hanno mostrato gravi deficit nella capacità di acquisire compiti spaziali.

Una delle azioni svolte da PKA è quella di fosforilare il fattore di trascrizione CREB. Tale modificazione permette l'ingresso di CREB all'interno del nucleo, dove si lega a vari fattori detti CREs, regolandone l'espressione (Zanassi et al 2001).

La proteina 14,3,3 è una proteina multifunzione ben conosciuta come attivatore della tirosina idrossilasi ma anche come proteina coinvolta in molteplici funzioni cellulari compresa l'attivazione della trascrizione. Delle 7 isoforme conosciute (β , γ , η , ϵ , σ , ζ , τ), le prime 5 sono molto

abbondanti nel cervello dei mammiferi e la isoforma ζ . sembra modulare l'attività della tirosina idrossilasi mitocondriale nei neuroni dopaminergici (Wang et al., 2009).

L'iniziale aumento dell'espressione dei geni di queste tre proteine seguito da una forte riduzione di espressione conferma il ruolo di innesco che la via del CREB ha nel passaggio da apprendimento BT ad apprendimento LT.

5.6 Espressione dei geni codificanti per proteine coinvolte in processi cellulari vari

L'ultimo gruppo di geni la cui espressione è risultata modulata da CFC comprende geni che codificano per proteine le cui funzioni al momento non sono chiarite in dettaglio e pertanto è difficile attribuire un significato funzionale alla variazione dell'espressione osservata. Si tratta dei geni per TIP41, proteina regolatrice della fosfatasi 2A; 2,3 bis-fosfoglicerato mutasi (BPGM), enzima trifunzionale con funzioni di sintasi, mutasi e fosforilasi; nardilisina, una metallo-proteina con funzione di proteasi e *Ras-related nuclear protein* (RAN), che svolge varie funzioni, nella replicazione del DNA, nella progressione del ciclo cellulare (Matsumoto & Beach 1994) e nella formazione della struttura nucleare (Sazer & Nurse 1994).

Nel complesso i risultati da noi ottenuti mostrano come in CFC si abbia modulazione dell'espressione di una vasta gamma di geni codificanti per proteine coinvolte in molteplici funzioni, alcune delle quali al momento non possono essere chiaramente inquadrare nei meccanismi che classicamente sono riconosciuti alla base dei fenomeni di apprendimento. Ulteriori indagini future potranno meglio chiarire il ruolo di tutti i geni individuati in questo studio.

5.7 Modulazione della sintesi proteica indotta da CFC

La modulazione dell'espressione di svariati geni da noi osservata in seguito a CFC pone la questione di verificare se alla modulazione genica corrisponde una analoga modulazione della sintesi delle proteine codificate.

A questo proposito nel presente lavoro è stato valutato se all'aumento di espressione dei geni per statmina 1 e profilina 2 corrispondesse un effettivo aumento della sintesi delle due proteine, così come se alla ridotta espressione del gene per amfifisina I corrispondesse una riduzione della sintesi della proteina. I risultati ottenuti mediante *western blotting* eseguiti su campioni di cervelli di ratti condizionati e sacrificati a 48 h e di cervelli di ratti *naïves* hanno mostrato una netta corrispondenza tra l'espressione genica e la traduzione in proteina.

In generale, il livello di espressione di una proteina non si può predire in base al livello di espressione del suo messaggero; i messaggeri possono presentare differenze legate all'uso di promotori distinti oppure di splicing alternativo; le proteine possono essere tradotte partendo da codoni di iniziazione differenti e inoltre sono frequentemente modificate mediante coniugazione.

Ci sono evidenze che suggeriscono che le proteine possano essere sintetizzate anche localmente nei dendriti; in questo modo il controllo della traduzione locale nei dendriti potrebbe avere un ruolo centrale nella plasticità esperienza-dipendente. Recentemente è stata identificata una piccola classe di molecole di RNA non codificante: i microRNA (miR) che hanno un ruolo nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica. I miR interagiscono, tramite una complementarità parziale, con il 3'UTR dell'mRNA target e agiscono a livello della traduzione inibendo sia l'iniziazione che l'allungamento e inducono occasionalmente la degradazione dell'mRNA. Esistono,

inoltre, prove del controllo esercitato da specifici miR sulla trascrizione locale e sulla plasticità in neuroni maturi (Ashraf et al., 2006).

Risulta pertanto difficile predire, partendo dall'analisi del cDNA in quali condizioni un gene viene trascritto e tradotto. Infine il numero di proteine espresse in un tessuto è dell'ordine di parecchie migliaia.

Sulla base di queste considerazioni l'analisi del proteoma (insieme delle proteine espresse da una cellula o da un tessuto in un dato momento funzionale) acquista una grande rilevanza in quanto permette, per esempio, di verificare se una determinata sequenza codificante è in realtà tradotta e quindi presente nel proteoma di un certo organismo o di un certo tessuto (Bernot, *Genome Transcriptome and Proteome Analysis*, Wiley Ed., 2005). Pertanto gli sviluppi futuri della presente ricerca mireranno ad introdurre analisi di proteomica nella definizione delle proteine implicate nel consolidamento di CFC.

Il fatto che questa forma di condizionamento al contesto e alla paura attivi l'espressione genica in modo così variegato stimola l'interesse ad approfondire e completare il quadro di geni e di proteine che possono essere implicate nell'apprendimento, nell'elaborazione di emozioni e più in generale nell'elaborazione cognitiva, allo scopo di chiarire sempre meglio i meccanismi molecolari che ne sono alla base: ciò potrà anche consentire di individuare strategie terapeutiche che possano prevenire deficit cognitivi spesso associati a malattie neurodegenerative.

6. BIBLIOGRAFIA

ABEL T., MARTIN K.C., BARTSCH D. and KANDEL E.R.(1998) "Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory" *Science* **279**:338-341

ALBERINI C.M., MILEKIC M.H., TRONEL S.(2006) "Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization" *Cell Mol Life Sci.* **63**(9):999-1008

ALONSO M., VIANNA M.R., IZQUIERDO I., MEDINA J.H. (2002) "Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus" *Cell Mol Neurobiol* **22**(5-6):663-74

ANAGNOSTARAS S.G., GALE G.D., FANSELOW M.S. (2001) "Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances" *Hippocampus* **11**:8-17

ANGELUCCI F., RICCI E., PADUA L., SABINO A., TONALI P.A. (2007) "Music exposure differentially alters the levels of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in the mouse hypothalamus" *Neuroscience Letters* **429**:152-5

ARTINIAN J., MCGAURAN A.M.T., DE JAEGER X., MOULEDOUS L., FRANCES B. and ROULLET P.(2008) "Protein degradation, as with protein synthesis, is required during not only long-term spatial memory consolidation but also reconsolidation" *European Journal of Neuroscience.* **27**:3009–3019

ASHRAF S.I., MCLOON A.L, SCLARSIC S.M., KUNES S. (2006) "Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*" *Cell* **124**:191–205.

AVVAKUMOV G.V., WALKER J.R., XUE S., LI Y., DUAN S., BRONNER C., ARROWSMITH C.H., DHE-PAGANON S. (2008) "Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1" *Nature* **455**(7214):822-5

BAILEY C.H. (1999) "Structural changes and the storage of long-term memory in *Aplysia*" *Can J Physiol Pharmacol* **77**(9):738-47

BARCO A., BAILEY C.H., KANDEL E.R. (2006) “Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory” *J. Neurochem.* **97**:1520-33

BARSZCZEWSKI M., CHUA J. J., STEIN A., WINTER U., HEINTZMANN R. (2008) “A Novel Site of Action for α -SNAP in the SNARE Conformational Cycle Controlling Membrane Fusion” *Molecular Biology of the Cell* **19**:776–784

BARZILAI A., KENNEDY SWETT J. D. and KANDEL E.R. (1992)“ Long-term sensitization on training in Aplysia leads to an increase in calreticulin, a major presynaptic calcium binding protein” *Neuron.* **9**(6):1013-24

BASSO, M., GIRAUDO, S., CORPILLO, D., BERGAMASCO, B., LOPIANO, L. and FASANO, M. (2004) “Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson’s disease” *Proteomics* **4**:3943–3952

BATASSA E.M., COSTANZI M., SARAULLI D., SCARDIGLI R., BARBATO C., COGONI C., CESTARI V. (2010) “RISC activity in hippocampus is essential for contextual memory” *Neurosci Lett.* **471**(3):185-8

BERARDI N, BRASCHI C, CAPSONI S, CATTANEO A, MAFFEI L. (2007) ”Environmental Enrichment Delays the Onset of Memory Deficits and Reduces Neuropathological Hallmarks in a Mouse Model of Alzheimer-Like Neurodegeneration”, *Journal of Alzheimer's Disease.***11**(3):359-70

BERNOT ”*Genome Transcriptome and Proteome Analysis*” Wiley Ed., 2005 NEW ‘CHEMISTRY’ BOOKS & SPECIAL JOURNAL ISSUES

BLACKWELL K.T. (2006) “Subcellular, cellular, and circuit mechanisms underlying classical conditioning in *Hermissenda crassicornis* ” *Anat Rec B New Anat* **289**(1):25-37

BLISS T.V., LOMO T. (1973) “Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path” *J Physiol* **232**(2):331-56

BLISS T.V.P., COLLINGRIDGE G .L. (1993) “A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus” *Nature* **361**: 31-39

BORRELLI E., NESTLER E.J., ALLIS C.D., SASSONE-CORSI P. (2008) "Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity" *Neuron* **60**(6):961-74

BRUNELLI M., CASTELLUCCI V., KANDEL E.R. (1976) "Synaptic facilitation and behavioral sensitization in Aplysia: possible role of serotonin and cyclic AMP" *Science* **194**:1178-1181

BRYNSKIKH A., WARREN T., ZHU J., KIPNIS J. (2008) "Adaptive immunity affects learning behavior in mice" *Brain Behav. Immun.* **22**: 861–869.

BURGESS N., JEFFERY K.J., O'KEEFE (1999) "The hippocampal and parietal foundations of spatial cognition" *Oxford: Oxford University Press*

CAMPBELL, D.S., and HOLT, C.E. (2003). "Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones" *Neuron* **37**, 939–952

CAYRE M., MALATERRE J., SCOTTO-LOMASSESE S., STRAMBI C., STRAMBI A. (2002) "The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates" *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **132**(1):1-15

CHAN, S.L., and MATTSON, M.P. (1999) "Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death" *J. Neurosci. Res.* **58**:167–190

CHAO M.V. (2003) "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways" *Nat Rev Neurosci* **4**(4):299-309

CHEN X., TOMCHICK D.R., KOVRIGIN E., ARAÇ D., MACHIUS M., SUDHOFF T.C., RIZO J. (2002) "Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex" *Neuron*. **33**: 397-409

CHEN Z.Y., PATEL P.D., SANT G., MENG C.X., TENG K.K., HEMPSTEAD B.L., LEE F.S. (2004) "Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons" *J Neurosci* **24**(18):4401-11

CHEN Z.Y., JING D., BATH K.G., IERACI A., KHAN T., SIAO C.J., HERRERA D.G., TOTH M., YANG C., MCEWEN B.S., HEMPSTEAD B.L., LEE F.S. (2006) "Genetic variant BDNF

(Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior” *Science* **314**(5796):140-3

CROW T. and XUE-BIAN J. J. (2010) “Proteomic analysis of post-translational modifications in conditioned *Hermisenda*” *Neuroscience* **165**: 1182-1190

DALE N., SCHACHER S., KANDEL ER. (1988) “Long-term facilitation in Aplysia involves increase in transmitter release” *Science*. **239** (4837):282-5

D'AMELIO M., CAVALLUCCI V., MIDDEI S., MARCHETTI C., PACIONI S., FERRI A., DIAMANTINI A., DE ZIO D., CARRARA P., BATTISTINI L., MORENO S., BACCI A., AMMASSARI-TEULE M., MARIE H., CECCONI F. (2011) “Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease” *Nat Neurosci*. **14**(1):69-76

DAVIS H.P., SQUIRE L.R. (1984) “Protein synthesis and memory: a review” *Psychol Bull* **96**(3):518-59

DE BENI R. and PALLADINO P. (2004) “Decline in working memory updating through ageing: intrusion error analyses” *Memory*. **12**(1): 75-89

DERECKI N.C., CARDANI A.N., YANG C.H., QUINNIES K.M., CRIHFIELD A., LYNCH K.R., KIPNIS J. (2010) “ Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4” *J. Exp. Med.* **207**: 1067–1080

DIAO W.F., HÖGER H., CHEN W.Q., POLLAK A., LUBEC G.(2007) “Hippocampal signaling protein levels are different in early and late metestrus in the rat” *Biochim Biophys Acta* **1774**(8):1044-51

DILLON C. and GODA Y.(2005) “The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse” *Annu Rev Neurosci.* **28**:25-55

DI PROSPERO, N.A., CHEN, E.Y., CHARLES, V., PLOMANN, M., KORDOWER, J.H. AND TAGLE, D.A. (2004)“Early changes in Huntington’s disease patient brains involve alterations in cytoskeletal and synaptic elements *J. Neurocytol.* **33**:517–533

DREW J.G.C., KYD J. R. and MORTON A. J. (2007) “Complexin 1 knockout mice exhibit marked deficits in social behaviours but appear

to be cognitively normal” *Human Molecular Genetics* 16:(19)2288–2305

DUDAI Y.(2002) “Molecular bases of long-term memories: a question of persistence” *Curr Opin Neurobiol* 12(2):211-6

ERIKSSON P.S., PERFILIEVA E., BJÖRK-ERIKSSON T., ALBORN A.M., NORDBORG C., PETERSON D.A., GAGE F.H. (1998) “Neurogenesis in the adult human hippocampus” *Nat Med* 4(11):1313-7

FANSELOW M.S (1990) “Factors governing one-trial contextual conditioning” *Anim. Learn Behav.* 18:264-270

FREEMAN, W. AND MORTON, A.J. (2004) “Regional and progressive changes in brain expression of complexin II in a mouse transgenic for the Huntington’s disease mutation” *Brain Res. Bull.* 63: 45–55

FUENTES-PRIOR G. and SALVESEN G.S. (2004) “The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition” *Biochem. J.* 384: 201-32

GLAZNER, G.W., CHAN, S.L., LU, C., and MATTSON, M.P. (2000). “Caspase-mediated degradation of AMPA receptor subunits: a mechanism for preventing excitotoxic necrosis and ensuring apoptosis” *J. Neurosci.* 20:3641–3649

GILMAN, C.P., and MATTSON, M.P. (2002). “Do apoptotic mechanisms regulate synaptic plasticity and growth-cone motility?” *Neuromolecular Med.* 2:197–214

GIRAUDO C.G., ENG W.S., MELIA T.J., ROTHMAN J.E (2006) ”A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis” *Science* 313(5787):676-80

GÓMEZ-PINILLA F., SO V., KESSLAK J.P. (2001) “Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus” *Brain Res.* 904(1):13-9

HAZELL, A.S. and WANG, C. (2005) Downregulation of complexin I and complexin II in the medial thalamus is blocked by N-acetylcysteine in experimental Wernicke’s encephalopathy. *J. Neurosci. Res.* 79:200–207

HEISENBERG M. (2003) “Mushroom body memoir: From maps to models” *Nat. rev. Neurosci.* **4**:266-275

HOEFER M.M., BONEBERG E.M, GROTEGUT S., KUSCH J., ILLGES H. (2006) “Possible tetramerisation of the proteasome maturation factor POMP/ proteasemblin/hUmp1 and its subcellular localisation” *Int J Biol Macromol* **38**:259–267

HUANG Y.Y., COLINO A., SELIG D.K., MALENKA R.C. (1992) “The influence of prior synaptic activity on the induction stage of long-term potentiation” *Science* **255**:730-733

HUANG E.J., REICHARDT L.F. (2001)“ Neurotrophins: roles in neuronal development and function” *Annu Rev Neurosci* **24**:677-736

HUESMANN, G.R., and CLAYTON, D.F. (2006) “Dynamic role of postsynaptic caspase-3 and BIRC4 in zebra finch song-response habituation” *Neuron* **52**:1061–1072

JAHN, R., and SCHELLER, R. H. (2006) “SNAREs—engines for membrane fusion”*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:631–643

KALB R. (2005) “the protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons” *trends neurosci* **28**(1):5-11

KALIL R.E. (1990) “ The influence of action potentials on the development of the central visual pathway in mammals” *J Exp Biol.* **153**:261-76

KANDEL E.R., HAWKINS R.D. (1992) “ The biological basis of learning and individuality” *Sci Am* **267**(3):78-86

KANO S., MIYAJIMA N., FUKUDA S., HATAKEYAMA S. (2008) “Tripartite motif protein 32 facilitates cell growth and migration via degradation of Abl-interactor 2”*Cancer Res.* **68**(14):5572-80

KELLEY J.B., ANDERSON K.L., ITZHAK Y. (2010) “Pharmacological modulators of nitric oxide signaling and contextual fear conditioning in mice ” *Psychopharmacology* **210**(1):65-74

KELLEY J.B., ANDERSON K.L., ALTMANN S.L., ITZHAK Y. (2011) “Long-term memory of visually cued fear conditioning: roles of the neuronal nitric oxide synthase gene and cyclic AMP response element-binding protein ” *Neuroscience* **174**:91-103

KEMPERMANN G, KUHN HG, GAGE FH. (1997) “More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment” *Nature*. **386**(6624):493-5

KEMPERMANN G, GAST D, KRONENBERG G, YAMAGUCHI M, GAGE FH. (2003) “Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice” *Development*. **130**(2):391-9

KEMPERMANN G., CHESLER E.J., LU L., WILLIAMS R.W., GAGE F.H. (2006) “Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis” *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(3):780-5

KIM J.J. and FANSELOW M.S.(1992) “Modality-specific retrograde amnesia of fear” *Science* **256**:675-677

KIPNIS J., COHEN H., CARDON M., ZIV Y., SCHWARTZ M. (2004) “T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**:8180–8185.

KLEIN M., CAMARDO J., KANDEL E.R. (1982) “Serotonin modulates a specific potassium current in the sensory neurons that show presynaptic facilitation in *Aplysia*” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:5713-5717

KO, L.J. and PRIVES, C. (1996). “p53: puzzle and paradigm” *Genes Dev*. **10**:1054–1072

KOUZARIDES T (2007) “Chromatin modifications and their function” *Cell* **128**:693–705

KOZOROVITSKIY L. and GOULD E. (2003) “Stem cell fusion in the brain” *Nat. Cell. Biol.* **5**(11):952-4

KUO, C.T., ZHU, S., YOUNGER, S., JAN, L.Y., and JAN, Y.N. (2006). “Identification of E2/E3 ubiquitinating enzymes and caspase activity regulating *Drosophila* sensory neuron dendrite pruning” *Neuron* **51** 283–290

LARSSON F, WINBLAD B, MOHAMMED AH (2002) “Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats” *Pharmacol Biochem Behav.* **73**(1):193-207

- LeDOUX J.E. (2000) "Emotion circuits in the brain" *Annu. Rev. Neurosci.* **23**:155-184
- LEE Y., WALKER D., DAVIS M. (1996) "Lack of temporal gradient of retrograde amnesia following NMDA-induced lesions of the basolateral amygdala assessed with the fear-potentiated startle paradigm" *Behav. Neurosci.* **110**:836-839
- LEE J.L., EVERITT B.J., THOMAS K.L. (2004) "Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation" *Science* **304**(5672):839-43
- LI Z., JO J., JIA J.M., LO S.C., WHITCOMB D. J., JIAO S., CHO K., and SHENG M. (2010) "Caspase-3 Activation via Mitochondria Is Required for Long-Term Depression and AMPA Receptor Internalization" *Cell* **141**:859–871
- LINNARSSON S., BJÖRKLUND A., ERNFORS P. (1997) "Learning deficit in BDNF mutant mice" *Eur J Neurosci* **9**(12):2581-7
- LIVAK K. J., and SCHMITTGEN T. D. (2001) "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T) Method" *Methods* **25**(4):402-8
- LU, C., FU, W., SALVESEN, G.S., and MATTSON, M.P. (2002)" Direct cleavage of AMPA receptor subunit GluR1 and suppression of AMPA currents by caspase-3: implications for synaptic plasticity and excitotoxic neuronal death" *Neuromolecular Med.* **1**:69–79
- MAJDAN M., MILLER F.D. (1999) "Neuronal life and death decisions functional antagonism between the Trk and p75 neurotrophin receptors." *Int J Dev Neurosci.* **17**(3):153-61
- MALENKA R.C. (1991) "Postsynaptic factors control the duration of synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus" *Neuron.* **6**: 53-60
- MAREN S., AHARONOW G., FANSELOW M.S. (1996) "Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in basolateral amygdala of rats: absence of a temporal gradient" *Behav. Neurosci.* **110**:718-726

MAREN S. and FANSELOW M.S. (1996) "The amigadala and fear conditioning: has the nut been cracked?" *Neuron*. **16**:237-240

MARTIN S.J., GRIMWOOD P.D. AND MORRIS R.G. (2000) "Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis" *Annu. Rev.Neurosci.* **23**:649-711

MARTIN P.D. & SHAPIRO M.L. (2000) "Disparate effects of long-term potentiation on evoked potentials and single CA1 neurons in the hippocampus of anesthetized rats" *HIPPOCAMPUS* **10**(3):207-12

MATSUMOTO, T., and D. BEACH. (1991). "Premature initiation of mitosis in yeast lacking RCC1 or an interacting GTPase" *Cell* **66**:347–360

MATSUMOTO Y., UNOKI S., AONUMA H., MIZUNAMI M. (2006) "Critical role of nitric oxide-cGMP cascade in the formation of cAMP-dependent long-term memory " *Learn Mem* **13**(1):35-44

MC NISCH K.A., GEWIRTZ J.C., DAVIS M. (1997) "Evidence of contextual fear after lesion of the hippocampus: a distrupction of freezing but not fear-potentiated startle" *J. Neurosci.* **17**:9353-9360

MCQUOWN S.C., BARRETT R.M., MATHEOS D.P., POST R.J., ROGGE G.A., ALENGHAT T., MULLICAN S.E., JONES S., RUSCHE J.R., LAZAR M.A., WOOD M.A. (2011) "HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation" *J Neurosci.* **31**(2):764-74

MILANOVICH S., RADULOVIC J., LABAN O., STIEDL O., HENN F., SPIESS J. (1998) "Production of the fos protein after contextual fear conditioning of C57BL/6N mice" *Brain Res.* **784**:37-47

MILLER C.A., SWEATT J.D. (2007) "Covalent modification of DNA regulates memory formation" *Neuron* **53**(6):857-69

MINICHELLO L., KORTE M., WOLFER D., KÜHN R., UNSICKER K., CESTARI V., ROSSI-ARNAUD C., LIPP H.P., BONHOEFFER T., KLEIN R. (1999) "Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning" *Neuron* **24**(2):401-14

MORGADO-BERNAL I. (2011) "Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data" *Neuroscience.* **176**:12-9

MORGAN J.A. and LeDOUX J.E. (1995) "Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats" *Behav. Neurosci.* **109**:681-688

MORII H., YAMADA T., NAKANO I., COULSON J.M., MORI N.(2006) "Site-specific phosphorylation of SCG10 in neuronal plasticity: role of Ser73 phosphorylation by N-methyl D-aspartic acid receptor activation in rat hippocampus" *Neurosci Lett* **396**(3):241-6

MORRELL C.N., MATSUSHITA K., CHILES K., SCHARPF R.B., YAMAKUCHI M., MASON R.J., BERGMEIER W., MANKOWSKI J.L., BALDWIN W.M. 3RD, FARADAY N., LOWENSTEIN C.J. (2005). "Regulation of platelet granule exocytosis by S-nitrosylation" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:3782–3787

MORRIS RG.M., ANDERSON E., LYNCH G.D., BAUDRY M. (1986) "Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation an n-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP 5" *Nature* **319**:774-776

MU J.S., LI W.P., YAO Z.B., ZHOU X.F. (1999) "Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats." *Brain Res* **835**(2):259-65

MUNDIGL O., OCHOA GC., DAVID C., SLEPNEV VI., KABANOV A., DE CAMILLI P.(1998) "Amphiphysin I antisense oligonucleotides inhibit neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons" *J Neurosci.* **18**(1):93-103

NÄGERL U.V., KÖSTINGER G., ANDERSON J.C., MARTIN K.A., BONHOEFFER T. (2007) " Protracted synaptogenesis after activity-dependent spinogenesis in hippocampal neurons" *J Neurosci.* **27**(30):8149-56

NGUYEN P.V., ABEL T., KANDEL E.R. (1994) " Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP " *Science* **265**(5175):1104-7

NILSON L, BARREGÅRD L, BÄCKMAN L. (1999) "Trail making test in chronic toxic encephalopathy: performance and discriminative potential" *Clin Neuropsychol.* **13**(3):314-27

O'KEEFE J. and NADEL L. (1978) "The hippocampus as a cognitive map" *Oxford: Clarendon Press*

OTA K.T., PIERRE V.J., PLOSKI J.E., QUEEN K., SCHAFE G.E. (2008) "The NOcGMP- PKG signaling pathway regulates synaptic plasticity and fear memory consolidation in the lateral amygdala via activation of ERK/MAP kinase" *Learn Mem* **15**:792–805

PARK M., SALGADO J.M., OSTROFF L., HELTON T.D., ROBINSON C.G., HARRIS K.M., EHLERS M.D. (2006) "Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes" *Neuron*. **52**(5):817-30

PAVLOV I.P. (1927) "Conditioned reflex" *London Oxford University*

PHILLIPS R.G. and LeDOUX J.E. (1992) "Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning" *Behav. Neurosci.* **106**:274-285

PERRY A.J., RIMMER K.A., MERTENS H.D., WALLER R.F., MULHERN T.D., LITHGOW T., GOOLEY P.R. (2008) "Structure, topology and function of the translocase of the outer membrane of mitochondria" *Plant Physiol Biochem.* **46**(3):265-74

PILO BOYL P., DI NARDO A., MULLE C., SASSOÈ-POGNETTO M., PANZANELLI P., MELE A., KNEUSSEL M., COSTANTINI V., PERLAS E., MASSIMI M., VARA H., GIUSTETTO M., WITKE W. (2007) "Profilin2 contributes to synaptic vesicle exocytosis, neuronal excitability, and novelty-seeking behavior" *EMBO J.* **6**(12):2991-3002

PINTÉR M., LENT D.D., STRAUSFELD N.J. (2005) "Memory consolidation and gene expression in *Periplaneta americana*" *Learn Mem.* **12**(1):30-8

POLLARD TD. and BORISY GG. (2003) "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments" *Cell.* **113**(4):549

RAMOS J. W., TOWNSEND D. A., PIARULLI D., KOLATA S., LIGHT K., HALE G. and MATZEL L. D. (2009) "Deletion of PEA-15 in mice is associated with specific impairments of spatial learning abilities" *Neuroscience* **10**:134

RAMPON C, JIANG CH, DONG H, TANG YP, LOCKHART DJ, SCHULTZ PG, TSIEN JZ, HU Y. (2000) "Effects of environmental

enrichment on gene expression in the brain” *Proc Natl Acad Sci U S A*. **797**(23):12880-4

RATTINER L.M., DAVIS M., RESSLER K.J. (2004) “Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor transcripts during the consolidation of fear learning” *Learn Mem* **11**(6):727-31

RIEDL G., MICHEAU J., LAM A.G.M., ROLOFF E.V.L., MARTIN S.G., BRIDGE H., de HOZ L., POESCHEL B., McCULLOCH J., MORRIS R.G.M. (1999) “Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes” *Nature Neurosci.* **2**: 898-905

RIOULT-PEDOTTI M.S., FRIEDMANN D., DONOGHUE J.P. (2000) “Learning-induced LTP in neocortex” *Science* **290**: 533-536

RIVAS- ARANCIBIA S. GUEVARA-GUZMAN R., LOPEZ-VIDAL Y., RODRIGUEZ-MARTINEZ E., ZANARDO-GOMES M., ANGOA-PEREZ M., AND RAISMAN-VOZARI R.(2010) ” Oxidative Stress Caused by Ozone Exposure Induces Loss of Brain Repair in the Hippocampus of Adult Rats” *TOXICOLOGICAL SCIENCES* **113**(1):187–197

RODRIGUES S.M., SCHAFE G.E., LeDOUX J.E. (2001) “Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning” *J. Neurosci.* **21**: 6889-6896

RON-HAREL N., SEGEV Y., LEWITUS G.M., CARDON M., ZIV Y., NETANELY D., JACOB-HIRSCH J., AMARIGLIO N., RECHAVI G., DOMANY E., SCHWARTZ M. (2008) “ Age-dependent spatial memory loss can be partially restored by immune activation” *Rejuvenation Res.* **11**: 903–913

ROSENEGGER D, WRIGHT C, LUKOWIAK K. (2010) “A quantitative proteomic analysis of long-term memory” *Mol Brain.* **23**: 3:9

ROSE J.K., RANKIN C.H. (2001) “Analyses Of Habituation In *Caenorhabditis Elegans*” *Learn mem* **8**(2):63-9

ROSEN J.B., HITCHCOCK J.M., MISERENDINO M.J.D., FALLS W.A. CAMPEAU S., DAVIS M. (1992) “Lesions of the perirhinal cortex but not of the frontal, medial prefrontal, visual, or insular cortex

block fear-potentiated startle using a visual conditioned stimulus” *J. Neurosci.* **12**: 4624-4633

RUDY J.W., HUFF N.C., MATUS-AMAT P. (2004) “Understanding contextual fear conditioning: insights a two-process model” *Neurosci. Biobehav. Rev.* **28**: 675-685

SACCHETTI B., AMBROGI LORENZINI C., BALDI E., TASSONI G., and BUCHERELLI C. (1999b) “Auditory thalamus, dorsal hippocampus, basolateral amygdala and perirhinal cortex role in consolidation on conditioned freezing to context and to acoustic conditioned stimulus in the rat” *J. Neurosci.* **19**: 9570-9578

SACCHETTI B., AMBROGI LORENZINI C., BALDI E., BUCHERELLI C., ROBERTO M., TASSONI G., and BRUNELLI M. (2001) “Long-lasting hippocampal potentiation and contextual memory consolidation” *Eur. J. Neurosci.* **13**: 2291-2298

SACCHETTI B., AMBROGI LORENZINI C., BALDI E., BUCHERELLI C., ROBERTO M., TASSONI G., and BRUNELLI M. (2002) “Time-dependent inhibition of hippocampal LTP *in vitro* following contextual fear conditioning in the rat” *Eur. J. Neurosci.* **15**: 143-150

SACCHETTI B., SCELFO B., TEMPIA F., STRATA P. (2004) “Long-term synaptic changes induced in the cerebellar cortex by fear conditioning” *Neuron.* **42**(6):973-82

SALE A., PUTIGNANO E., CANCEDDA L., LANDI S., CIRULLI F., BERARDI N., MAFFEI L. (2004) “Enriched environment and acceleration of visual system” *development Neuropharmacology.* **47**: 649–660

SALE A., BERARDI N., MAFFEI L. (2009) “Enrich the environment to empower the brain”, *Trends in Neurosciences*; **32**(4):233-9

SAZER, S., and P. NURSE. (1994) “A fission yeast RCC1-related protein is required for the mitosis to interphase transition” *EMBO J.* **13**:606–615

SCHLÜTER K., JOCKUSCH BM., ROTHKEGEL M. (1997) “Profilins as regulators of actin dynamics” *Biochim Biophys Acta* **1359**(2):97-109

SCHULZ P., COOK E., JOHNSTON D. (1994) “ Changes in paired-pulse facilitation suggest presynaptic involvement in long-term potentiation” *J. Neurosci.* **14**: 5325-5337

SCHWARTZ M. and SHECHTER R. (2010) “ Protective autoimmunity functions by intracranial immunosurveillance to support the mind: the missing link between health and disease” *Mol. Psychiatry* **15**, 342–354

SCURI R., MOZZACHIODI R., BRUNELLI M. (2002). Activity dependent increase of the AHP amplitude in T sensory neurons of the leech. *J. Neurophysiol.* **88**: 2490-2500

SCURI R., LOMBARDO P., CATALDO E., RISTORI C., BRUNELLI M. (2007) “Inhibition of Na⁺/K⁺ ATPase potentiates synaptic transmission in tactile sensory neurons of the leech” *Eur J Neurosci* **25**(1):159-67

SHIMIZU E., TANG Y.P., RAMPON C., TSIEN J.Z. (2000) “NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation” *Science* **290**: 1170-1174

SHORS T.J., MIESEGAES G., BEYLIN A., ZHAO M., RYDEL T., GOULD E. (2001) “Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories” *Nature* **410**(6826):372-6

SHORS T.J., TOWNSEND D.A., ZHAO M., KOZOROVITSKIY Y., GOULD E. (2002) “Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning” *Hippocampus* **12**(5):578-84

SHUMYATSKY GP., MALLERET G., SHIN RM., TAKIZAWA S., TULLY K., TSVETKOV E., ZAKHARENKO SS., JOSEPH J., VRONSKAYA S, YIN D, SCHUBART UK, KANDEL ER, BOLSHAKOV VY (2005) “stathmin, a gene enriched in the amygdala, controls both learned and innate fear “*Cell.* **123**(4):697-709

SNYDER S.H. (1992) “ Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters” *Science* **257**(5069):494-6

SORRA K.E., FIALA J.C., HARRIS K.M. (1998) “Critical assessment of the involvement of perforations, spinules, and spine branching in hippocampal synapse formation” *J Comp Neurol.* **398**(2):225-40

SRINIVASULA, S.M., and ASHWELL, J.D. (2008) "IAPs: what's in a name?" *Mol. Cell* **30**, 123–135

STEFANKO D.P., BARRETT R.M., LY A.R., REOLON G.K., WOOD M.A. (2009) "Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition" *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:9447–9452

SÜDHOF TC, ROTHMAN JE (2009) "Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins" *Science* **323**(5913):474-7

VRONSKAYA S., YIN D., SCHUBART UK., KANDEL ER., BOLSHAKOV VY. (2005) "stathmin, a gene enriched in the amygdala, controls both learned and innate fear" *Cell*. **123**(4):697-709

SQUIRE L.R., (1992) "Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkey and humans" *Psychol.Rev.* **99**: 195-231

THOMPSON L.T., MOYER J.R.Jr, DISTERHOFT J.F. (1996) "Transient changes in excitability of rabbit CA3 neurons with a time-course appropriate to support memory consolidation" *J. Neurophysiol.* **76**: 1836-1849

UDO H., JIN I., KIM J.H., LI H.L., YOUN T., HAWKINS R.D., KANDEL E.R., BAILEY C.H. (2005) "Serotonin-induced regulation of the actin network for learning-related synaptic growth requires Cdc42, N-WASP, and PAK in Aplysia sensory neurons" *Neuron* **45**(6):887-901

WANG, X., SU, B., FUJIOKA, H., ZHU, X.(2008). " Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients" *Am. J. Pathol.* **173**:470–482

WANG J., LOU H., PEDERSEN C. J., SMITH A. D., and PEREZ G. R. (2009) " 14-3-3 Contributes to Tyrosine Hydroxylase Activity in MN9D Cells localization of dopamine regulatory proteins to mitochondria" *The Journal of Biological Chemistry* **284**(21):14011–14019

WATERS N.S., KLINTSOVA A.Y., FOSTER T.C. (1997) "Intensivity of the hippocampus to environmental stimulation during postnatal development" *J. Neurosci.* **17**: 7967-7973

WEGNER AM., NEBHAN CA., HU L., MAJUMDAR D., MEIER KM., WEAVER AM., WEBB DJ. (2008) "N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses" *J Biol Chem.* **283**(23):15912-20

WETZEL M. K., NASKA S., LALIBERTE' C. L. , RYMAR V. V., FUJITANI M.,BIERNASKIE J. A., COLE C. J., LERCH J. P., SPRING S., WANG S.-H., FRANKLAND P. W., HENKELMAN R. M., JOSSELYN S. A., SADIKOT A. F., MILLER F. D., and KAPLAN D. R.(2008) "p73 Regulates Neurodegeneration and Phospho-Tau Accumulation during Aging and Alzheimer's Disease " *Neuron* 59:708–721

WILLIAMS J.M., THOMPSON V.L., MASON-PARKER S.E., ABRAHAM W.C., TATE W.P. (1998) "Synaptic activity-dependent modulation of mitochondrial gene expression in the rat hippocampus" *Mol. Brain Res.* **60**: 50-56

WILLIAMS, D.W., KONDO, S., KRZYZANOWSKA, A., HIROMI, Y., and TRUMAN, J.W. (2006) "Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning" *Nat. Neurosci.* **9**:1234–1236

WITKE W., PODTELEJNIKOV AV., DI NARDO A., SUTHERLAND JD., GURNIAK CB., DOTTI C., MANN M. (1998) "In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly" *EMBO J.* **17**(4):967–76

XU T., YU X., PERLIK A.J., TOBIN W.F., ZWEIG J.A., TENNANT K., JONES T., ZUO Y. (2009) "Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories" *Nature* **462**(7275):915-9

YAMADA M, SAISU H, ISHIZUKA T, TAKAHASHI H, ABE T.(1999) " Immunohistochemical distribution of the two isoforms of synaphin/complexin involved in neurotransmitter release: localization at the distinct central nervous system regions and synaptic types" *Neuroscience* **93**:7-18.

YAMADA H, OHASHI E, ABE T, KUSUMI N, LI SA, YOSHIDA Y, WATANABE M, TOMIZAWA K, KASHIWAKURA Y, KUMON H, MATSUI H, TAKEI K.(2007) "Amphiphysin 1 is important for actin polymerization during phagocytosis" *Mol Biol Cell.* **18**(11):4669-80

YAMADA K., MATSUZAKI S., HATTORI T., KUWAHARA R., TANIGUCHI M., HASHIMOTO H., SHINTANI N., BABA A., KUMAMOTO N., YAMADA K., YOSHIKAWA T., KATAYAMA T., TOHYAMA M. (2010) "Increased stathmin1 expression in the dentate gyrus of mice causes abnormal axonal arborizations" *PLoS One*. **5**(1):e8596

YANG C., SILVER B., ELLIS S.R., MOVER G.D. (2001) "Bidirectional regulation of mitochondrial gene expression during developmental neuroplasticity of visual cortex" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**: 1070-1074

YIRMIYA R., GOSHEN I. (2011) "Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis" *Brain Behav Immun* **25**(2):181-213

YOON S.O., CASACCIA-BONNEFIL P., CARTER B., CHAO M.V. (1998) "Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival" *J Neurosci* **18**(9):3273-81

YOON TY, LU X, DIAO J, LEE SM, HA T, SHIN YK. (2008) "Complexin and Ca²⁺ stimulate SNARE-mediated membrane fusion" *Nat Struct Mol Biol.* **15**:707-13

YOUNG S.L., BOHENEK L., FANSELOW M.S. (1994) "NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: Immunization against amnesia by context preexposure" *Behav. Neurosci.* **108**:19-29

YUAN, J. (2006)" Divergence from a dedicated cellular suicide mechanism: exploring the evolution of cell death" *Mol. Cell* **23**:1–12

ZANASSI P, PAOLILLO M, FELICIELLO A, AVVEDIMENTO EV, GALLO V, SCHINELLI S. (2001) "cAMP-dependent protein kinase induces cAMP-response element-binding protein phosphorylation via an intracellular calcium release/ERK-dependent pathway in striatal neurons" *J Biol Chem.* **276**(15):11487-95

ZHANG M., MOON C., CHAN G.C., YANG L., ZHENG F., CONTI A.C., MUGLIA L., MUGLIA L.J., STORM D.R., WANG H. (2008) "Ca-stimulated type 8 adenylyl cyclase is required for rapid acquisition of novel spatial information and for working/episodic-like memory" *J Neurosci.* **28**(18):4736-44